

T.C
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Fizyoloji Anabilim Dalı

SIÇANLARDA SEPSİS ÖNCESİ ORAL NATTOKINASE
UYGULAMASININ KOAGÜLASYON, ERİTROSİT
AGREGASYONU VE KAN VİSKOZİTESİNE ETKİLERİ

Melike CENGİZ

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2007

T.C
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Fizyoloji Anabilim Dalı

SIÇANLARDA SEPSİS ÖNCESİ ORAL NATTOKINASE
UYGULAMASININ KOAGÜLASYON, ERİTROSİT
AGREGASYONU VE KAN VİSKOZİTESİNE ETKİLERİ

Melike CENGİZ

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Oğuz Kerim BAŞKURT

“Kaynakça Gösterilerek Tezinden Yaralanılabilir”

Antalya, 2007

Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne
Bu çalışma, jürimiz tarafından Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez danışmanı: Prof. Dr. Oğuz Kerim BAŞKURT
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Aysel AĞAR
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. V. Nimet UYSAL
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

Üye: Doç. Dr. Filiz GÜNDÜZ
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Atilla RAMAZANOĞLU
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../2007 tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nurettin Oğuz

Enstitü Müdürü

ÖZET

Nattokinase (Nattokinaz) potent fibrinolitik aktivitesi olduğu gösterilmiş, haşlanmış soya fasülyesinin *Basillus subtilis natto* kullanılarak fermente edilmesiyle elde edilen, Japonya'ya özgün geleneksel besin maddesi olan bir serin proteazdır. Bu deneysel çalışmanın amacı, sıçanlara sepsis öncesi 7 gün intragastrik nattokinaz verilmesinin plazma fibrinojen seviyesi, hemoreolojik parametreler ve mortalite üzerine etkilerinin incelenmesidir.

Çalışmada 100 tane 180–250 gram ağırlığında Wistar tipi genç dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlardan 60 tanesi, 0.6 mg/gün dozda nattokinaz uygulanarak biyokimyasal ve reolojik parametrelerin analizi (Deney 1) amacıyla, 20 tanesi 6 mg/gün dozda nattokinaz uygulanarak biyokimyasal ve reolojik parametrelerin analizi (Deney 2) amacıyla, 20 tanesi ise hayatta kalma analizi (Deney 3) yapılması amacıyla farklı üç deneyde kullanıldı.

Çalışmamızın sonucunda;

1. Düşük dozda (0.6 mg/gün) nattokinaz kullanılan Deney 1'de, nattokinaz uygulanan gruplarda plazma fibrinojen düzeyi, plazma viskozitesi ve eritrosit agregasyonunda istatistiksel olarak önemli olmayan azalma tespit edildi. Eritrosit deformabilitesi bulgularında ise gruplar arasında fark görülmedi.
2. Yüksek dozda (6 mg/gün) nattokinaz uygulanan sıçanlarda kan viskozitesi ve plazma fibrinojen değişikliklerinin araştırıldığı Deney 2'de gruplar arasında önemli fark bulunmadı.
3. Nattokinaz+Çekal ligasyon ile Çekal ligasyon grupları arasında hayatta kalma sıklığı ve yaşam süresi açısından önemli fark bulunmadı.

Sonuç olarak; sıçanlarda çekal ligasyon ve delme ile oluşturulan intraabdominal sepsis öncesi 7 gün boyunca intragastrik nattokinaz verilmesi plazma fibrinojen seviyesi, kan ve plazma viskozitesi, eritrosit agregasyonu ve deformabilitesi ile sepsise bağlı mortalite üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmamıştır. Ancak farkın önemli olmamasının uygulanan nattokinaz dozu, uygulama süresi ve denek sayısı ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Nattokinaz, sepsis, fibrinojen, viskozite, agregasyon

ABSTRACT

Nattokinase is a serin protease having potent fibrinolytic effect, which is an authentic traditional food in Japan, derived from fermentation of boiled soy bean by the use of *Basillus Subtilis Natto*. The aim of this experimental study is to investigate the effects of intragastric nattokinase administration for 7 days prior formation of sepsis in rats with caecal ligation and puncture (CLP) on plasma fibrinogen levels, hemorrheologic parameters and mortality.

One hundred adult female Wistar rats of 180-250 grams were used in the study. Biochemical and rheologic parameters were analysed using 0.6 mg/day nattokinase in 60 rats (Experiment 1) and 6 mg/day nattokinase in 20 rats (Experiment 2). Survival analysis was performed with 20 rats (Experiment 3).

Our findings:

1. A statistically insignificant reduction in plasma fibrinogen, plasma viscosity and red blood cell aggregation occurred in Experiment 1. There was no difference on behalf of red blood cell deformability between groups.
2. There was no significant difference in terms of mean plasma fibrinogen levels and blood viscosity of rats between groups in Experiment 2.
3. No difference was found in survival rates and survival times in Experiment 3.

As a result; intragastric nattokinase administration for 7 days prior formation of sepsis in rats with CLP had no statistically significant effect on plasma fibrinogen levels, blood and plasma viscosity, red blood cell aggregation, deformability and sepsis related mortality. The dosage and delivery period of nattokinase and number of subjects included in the study may be the reason of insignificant results.

Key Words: Nattokinase, sepsis, fibrinogen, viscosity, aggregation

TEŞEKKÜR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimim süresince, eğitimime emeği geçen tüm hocalarıma, tez hocam Sayın Prof. Dr. Oğuz Kerim Başkurt'a,

Tezime yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Sayın Özlem Yalçın, Pınar Ülker ve Mehmet Üyüklü'ye,

Anesteziyoloji ve Reanimasyon Ana bilim dalı'nda bana tüm çalışmalarım da destek olan hocam Prof. Dr. Atilla Ramazanoğlu ve ağabeylerim Sayın Levent Döşemeci ve Sayın Murat Yılmaz'a

Fizyoloji Anabilim dalındaki çalışmalarım da yardımlarını esirgemeyen tüm asistan arkadaşlarıma,

Hayvan Laboratuvarındaki destek ve yardımlarından ötürü başta Sayın Vet. Hekim Şakir Atalay olmak üzere tüm deney hayvanları ünitesi ekibine, Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Sayın Doç. Dr. Sebahat Özdem'e Teşekkür ediyorum.

Melike CENGİZ

Antalya, 2007

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa No:

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	2
2.1. Doğal Koagülasyon ve Antikoagülasyon Mekanizmaları	3
2.2. Fibrinolitik Mekanizmalar	3
2.3. Sepsiste Koagülasyon Anormallikleri	3
2.4. Fibrinolitik/Fibrinojenolitik Tedavide Deneysel Yaklaşımlar	5
2.5. Nattokinaz	7
2.6. Kanın Akışkanlık Özellikleri	8
2.6.1. Plazma ve Kan Viskozitesi	8
2.6.2. Eritrosit Agregasyonu	8
2.6.3. Eritrosit Deformabilitesi	9
2.7. Hipotez	10
3.GEREÇ VE YÖNTEM	11
3.1. Deney Protokolü	11
3.1.1. Deneylerin Tanımlanması	11
3.1.2. Deneylerde Yeralan Gruplarda Yapılan Uygulamaların Tanımlanması	11
3.1.2.1. Biyokimyasal ve Reolojik Analiz Deney Grupları	11
3.1.2.2. Hayatta Kalma Analizi Deney Grupları	13
3.2. Deneysel Sepsis Modeli Oluşturulması	13
3.3. Hayatta Kalmanın Değerlendirilmesi	13
3.4. Biyokimyasal Parametreler	13
3.4.1. Plazma Fibrinojen Düzeyi Ölçümü	14
3.4.2. C-Reaktif Protein Düzeyi Ölçümü	14
3.4.3. D-Dimer Düzeyi Ölçümü	14
3.4.4. TNF-alfa Düzeyi Ölçümü	14
3.5. Reolojik Parametreler	14
3.5.1. Tam Kan Viskozitesi	14
3.5.2. Plazma Viskozitesi	15
3.5.3. Eritrosit Agregasyonu	15

3.5.4. Eritrosit Deformabilitesi	15
3.6. İstatistiksel Analiz	16
4. BULGULAR	17
4.1. Düşük dozda (0.6 mg/gün) Nattokinaz Uygulanarak Yapılan Analizlerin (Deney 1) Sonuçları	17
4.1.1. Biyokimyasal Analiz Sonuçları	17
4.1.1.1. Fibrinojen Düzeyi Sonuçları	17
4.1.1.2. CRP ve D-Dimer Düzeyi Sonuçları	17
4.1.1.3. TNF- α Düzeyi Sonuçları	17
4.1.2. Reolojik Analiz Sonuçları	18
4.1.2.1. Tam Kan Viskozitesi Sonuçları	18
4.1.2.2. Plazma Viskozitesi Sonuçları	18
4.1.2.3. Eritrosit Agregasyonu Sonuçları	18
4.1.2.4. Eritrosit Deformabilitesi Değerlendirilmesi Sonuçları	20
4.2. Yüksek Dozda (6 mg/gün) Nattokinaz Uygulanarak Yapılan Analizlerin (Deney 2) Sonuçları	21
4.2.1. Fibrinojen Düzeyi Sonuçları	21
4.2.2. Tam Kan Viskozitesi Sonuçları	21
4.3. Hayatta Kalma Analizi Sonuçları	23
5. TARTIŞMA	25
6. SONUÇ	29
7. KAYNAKLAR	30
8. ÖZGEÇMİŞ	36

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

PAİ-1	Plazminojen aktivatör inhibitör-1
DFYİ	Doku faktörü yolağı inhibitörü
AT III	Antitrombin III
DİK	Yaygın damar içi pıhtılaşma
MODS	Çoklu organ yetersizliğı
ÇLD	Çekal ligasyon ve delme
TNF-α	Tümör nekrozis faktör- α
İL-6	İnterlökin 6
t-PA	Doku tipi plazminojen aktivatörü
ü-PA	Ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü
cP	Centipoise

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa No
2.1. Koagülasyon ve fibrinolitik sistemin şematik gösterimi	4
2.2. Sepsiste sitokin ilişkili mikrovasküler trombozun patojen yolakları	5
2.3. Viskoziteyi belirleyen faktörler	9
4.1. Düşük dozda (0.6 mg/gün) nattokinaz uygulanarak yapılan deneyde plazma fibrinojen düzeyleri ortalamaları ve standart hataları	17
4.2. Düşük dozda (0.6 mg/gün) nattokinaz uygulanarak yapılan deneyde plazma fibrinojen düzeyleri ortalamaları ve standart hataları	18
4.3. Düşük dozda (0.6 mg/gün) nattokinaz uygulanarak yapılan deneyde plazma fibrinojen düzeyleri ortalamaları ve standart hataları	19
4.4. Düşük dozda (0.6 mg/gün) nattokinaz uygulanarak yapılan deneyde grupların otolog plazma içerisinde ölçülen eritrosit agregasyon indeksi (M) indeksi ortalamaları ve standart hataları	19
4.5. Düşük dozda (0.6 mg/gün) nattokinaz uygulanarak yapılan deneyde %1 Dekstran 500'ün PBS içerisindeki çözeltisinde ölçülen eritrosit agregasyon (M) indeksleri ortalamaları ve standart hataları	20
4.6. Düşük dozda (0.6 mg/gün) nattokinaz uygulanan deneyde gruplara ait maksimum elongasyon indeksinin yarısı kadar şekil değiştirmeye neden olan kayma kuvveti ($SS_{1/2}$) değerleri ortalaması ve standart hataları	20
4.7. Yüksek dozda (6 mg/gün) nattokinaz uygulanarak yapılan deneyde plazma fibrinojen düzeyleri ortalamaları ve standart hataları	22
4.8. Yüksek dozda (6 mg/gün) nattokinaz uygulanarak yapılan deneyde laparotomi (sham), nattokinaz ve çekal ligasyon ile çekal ligasyon gruplarının farklı kayma hızlarında viskozite değişimleri eksponansiyel olarak gösterilmesi	22
4.9. Hayatta kalma analizi sonuçlarının Kaplan-Meier metodu ile karşılaştırılması gösterilmesi	24

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa No:
2.1: Geleneksel besinlerde çeşitli basil tipleri ile elde edilen fibrinolitik/fibrinojenolitik enzimler	6
4.1. Hayatta kalma analizi yapılan gruplar, ölüm sıklığı ve sıçanların ölüm saatleri	23

GİRİŞ

Sepsis, organizmanın sistemik inflamasyona verdiği yanıttır ve inflamasyonu başlatan infeksiyonun doğrudan etkilemediği birçok organ veya organ sistemlerinde, geri döndürülebilme ihtimali olan akut fonksiyon bozukluklarına neden olabilir. Sepsiste, pıhtılaşma faktörlerinin kullanımında artış ve koagülasyon - antikoagülasyon arasındaki dengede koagülasyon lehine bozulma olur. Sepsisten septik şoka ilerleyen süreçte fibrinoliz erken dönemde aktive olurken, geç evrelerde baskılanır. Mikrovasküler yatakta fibrin depolanması organ perfüzyonunda ve parankimal hücre fonksiyonlarında bozukluk gelişmesine ve buna bağlı organ yetersizliği ve ölüme neden olur (1).

Nattokinaz potent fibrinolitik aktivitesi olduğu gösterilmiş, *Basillus Subtilisten* elde edilen bir serin proteazdır. Bu enzimin fibrinolizi arttırıcı etki mekanizması tam olarak anlaşılammakla birlikte direkt olarak fibrini erittiği düşünülmektedir. Ayrıca, nattokinazın plazminojenin plazmine dönüşmesini engelleyen plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) enziminin aktif bölgesinde sınırlı bir proteoliz yaparak enzimin inhibisyonuna neden olduğu ve böylece plazminojenin plazmine dönüşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir (2).

Nattokinazın fibrinolitik aktivitesinin dışında güçlü fibrinojenolitik etkisinin bulunduğu ve çözünebilir plazma fibrinojen seviyelerinde azalmaya neden olduğu öne sürülmüştür (3). Sepsiste akut faz reaktanı olan fibrinojenin düzeyinde artış olduğu ve fibrinojen artışının kan viskozitesi ve eritrosit agregasyonunda değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (4,5). Sepsis modelinde, nattokinazın fibrinolitik/fibrinojenolitik işlevlerinin eritrositlerin reolojik özellikleri ve kanın akışkanlığı üzerine etkilerini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu deneysel çalışmanın amacı, sıçanlara sepsis öncesi intragastrik nattokinaz verilmesinin plazma fibrinojen seviyesi, tam kan ve plazma viskozitesi, eritrositlerin reolojik özellikleri (agregasyon, deformabilite) ve mortalite üzerine etkilerinin incelenmesidir.

GENEL BİLGİLER

2.1. Doğal Koagülasyon ve Antikoagülasyon Mekanizmaları

Çoğunluğu karaciğerde üretilen pıhtılaşma faktörleri ihtiyaç halinde belirli bir sıra ile aktifleşerek koagülasyon yolağının son ürünü olan fibrini oluşturur (Şekil 2.1). Fizyolojik şartlar altında bu tepkimeler minimal düzeyde uyarılmıştır. Patolojik düzeyde pıhtı oluşumu doğal antikoagülan sistem ve fibrinolitik sistemlerin dengeleyici etkileri yardımıyla engellenir. Bu hassas dengenin korunmasında endotelin önemli katkıları vardır. Çünkü birçok doğal antikoagülan ve fibrinolitik uyarıcı molekülün üretimi ve işlev görmeleri endotel tarafından sağlanır. Fizyolojik koagülasyon yolağı en fazla ekstravasküler hücrelerden salındığı bilinen doku faktörünün, kandaki faktör VII ile ilişkiye geçmesi sonrası etkinleşir. Doku faktörüne bağlanan faktör VII, trombin, faktör Xa veya komşu faktör VIIa-doku faktörü kompleksleri ile kolayca aktifleştirilir. Faktör VIIa-doku faktörü kompleksi ise faktör IX veya faktör X'u aktif enzim formuna dönüştürür. Takiben F Xa protrombinden trombin oluşumunu sağlar (6).

Pıhtı oluşumunda görevli olan trombinin etkili olabilmesi için güçlendirilmesi gerekir. Fosfolipidler ve fosfotidil serin düzeyleri yüksek olan hücre yüzeyleri trombin güçlendirilmesi için uygundur. Doku faktörü-faktör VIIa kompleksinin koagülasyonu tetikleyici aktivasyonları başlatmasındaki rolü dışında negatif yüklü fosfolipidler birkaç mekanizma ile koagülasyon reaksiyonlarının güçlenmesini sağlar. Bu mekanizmalardan birincisi yüzeye faktör IXa, VIIIa, X, Xa, protrombin ve Va'nın bağımsız olarak bağlanabilmesidir. Bu bağlanmalar enzimler (faktör IXa ve Xa) ve kofaktörler (faktör VIIIa ve Va) arasında fonksiyonel kompleksler kurulmasını sağlar. Membran yüzeyi olmadığı durumlarda bahsedilen protein-protein ilişkileri oldukça zayıftır. Ayrıca substrat (faktör IX, X veya protrombin) konsantrasyonunun artması, substratların aktivasyon için ideal pozisyona geçmeleri ve konfigürasyon değişikliklerinin gerçekleştirilmesinde membran yüzeyinin etkisi büyüktür (7).

Koagülasyon işleminin kontrol edilmesinden 3 temel mekanizma sorumludur. Bu mekanizmalar şunlardır:

- Doku faktör yolağı inhibitörü: Doku faktör yolağı inhibitörü doku faktörüne bağlı olan faktör VIIa'nın aktivasyonunu engeller. İnhibitörün iki etki bölgesi vardır. Bunlardan ilki faktör VIIa'yı ikincisi ise faktör Xa'yı etkisiz hale getirir (8).
- Heparin-antitrombin yolağı: Antitrombin-heparin mekanizması vasküler heparin benzeri proteoglikanlar yolu ile faktör Xa, trombin, faktör IXa ve doku faktörüne bağlı faktör VIIa'nın etkilerini nötralize eder (9).
- Protein C antikoagülan yolağı: Trombin endotel hücre yüzeyindeki trombomodüline bağlandığında protein C yolağı aktif hale geçer. Protein C, trombin-trombomodülin kompleksi tarafından aktif hale getirilebileceği gibi protein C'nin endotel hücresi üzerindeki reseptörü üzerine bağlanması da aktifleşmesine neden olur. Aktif protein C reseptöründen ayrıldıktan sonra protein S ile bağlanarak faktör Va ve VIIIa'yı proteolitik olarak inaktif hale

getirir. Bu kofaktörler olmadan faktör Xa ve IX'a koagülasyon yolağını etkili şekilde işletemez (10).

İnsanlarda heparin-antitrombin yolağı veya protein C yolağındaki bozukluklar tromboz gelişme riskini arttırırken doku faktörü yolağı inhibitörü eksikliğinin etkileri belirgin değildir. Bu yolakların fizyolojik önemleri farelerde gen değiştirilmesi yöntemi ile araştırılmıştır. Tek bir yolağın engellenmesi bile embriyonik veya neonatal ölüm ile sonuçlanmıştır (11,12,13).

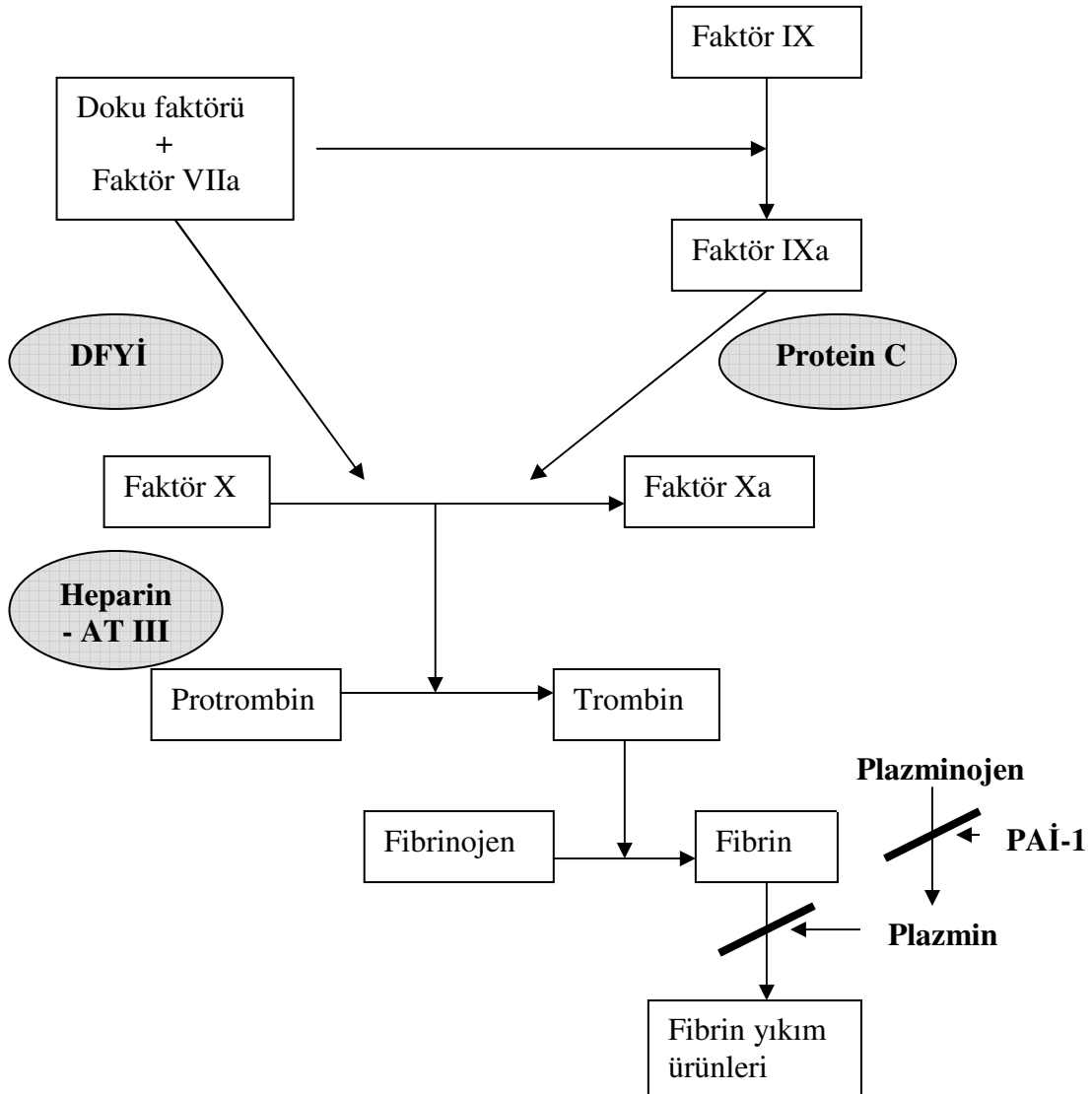
2.2. Fibrinolitik Mekanizmalar

Oluşan trombüsün temizlenebilmesi için fibrinoliz gereklidir. Fibrinoliz plazminojen aktivatörleri aracılığı ile plazminojenin aktif hale getirilmesi yoluyla gerçekleşir ve fibrin çözünebilir fibrin yıkım ürünlerine dönüştürülür. Fibrinolitik sistem inhibisyonu ya direkt olarak plazmin (α_2 - antiplazmin veya α_2 - makroglobulin) ya da plazminojen aktivatörlerinin etkilerinin engellenmesi ile olur (14). PAİ-1 ile hızla inhibe edilebilir. PAİ-1 birçok dokuda bulunmaktadır. PAİ-1 'in aktif olmayan formunu içeren trombositler dışında, hiçbir hücrede depolanmaz ve sentez sonrasında hızla dolaşıma verilir (15).

2.3. Sepsiste Koagülasyon Anormallikleri

Sepsisli hastalarda trombosit sayısında azalma ve pıhtılaşma zamanında uzama gibi küçük koagülasyon anormallikleri olabileceği gibi yaygın mikrovasküler tromboz ve birçok alanda eş zamanlı kanama ile karakterize yaygın damar içi pıhtılaşma (DİK) da gözlenebilir. DİK tromboembolik olaylara veya mikrovasküler fibrin birikmesi sonucu çoklu organ yetersizliklerine (Multi-organ deficiency syndrome=MODS) neden olabilir (16). Sepsiste gelişen DİK karmaşık bir patofizyolojiye sahiptir ve koagülasyonu düzenleyici birden fazla yolakta, aynı zamanda bozukluklar meydana gelir. Yapılan hayvan çalışmalarında, sepsiste DİK gelişmesi sırasında gözlenen koagülasyon aktivasyonunun doku faktörü/faktör VIIa kompleksine (ekstremsk koagülasyon yolağı) dayalı olduğu gösterilmiştir (17).

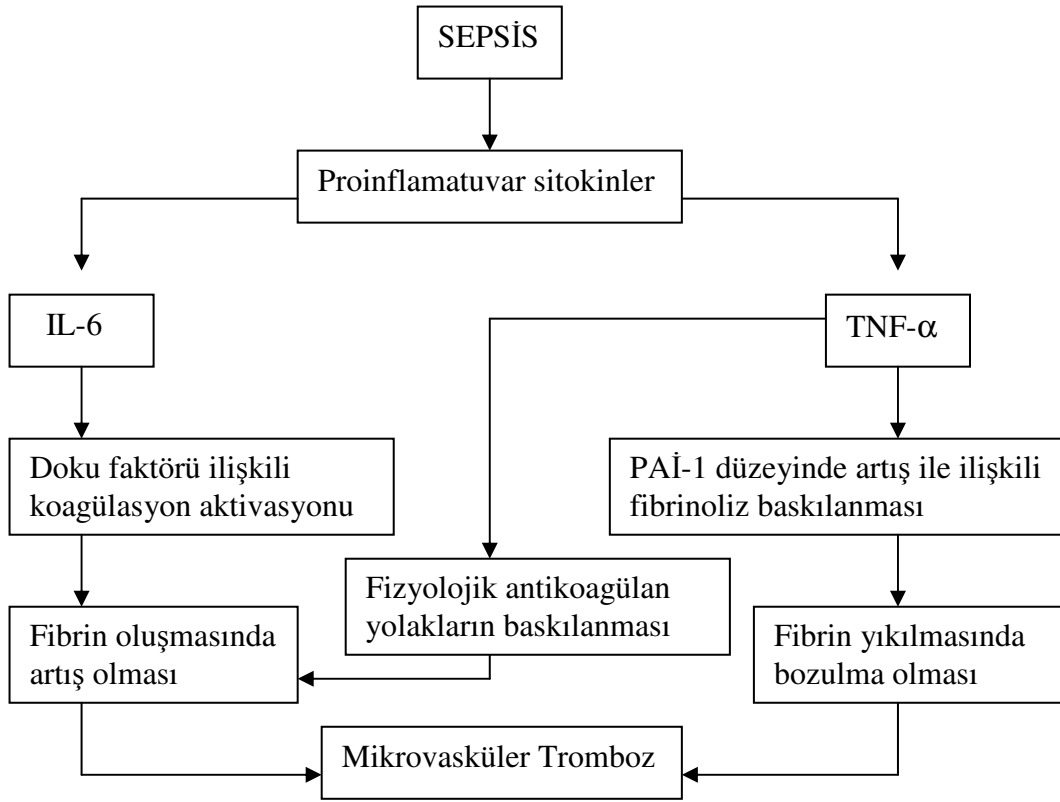
Fizyolojik koşullarda doku faktörü vasküler endotelin lümene bakan yüzeyinde saptanamaz ancak dolaşımdaki kan hücrelerinde çok düşük miktarlarda bulunabilir. İnfeksiyon durumunda veya endotoksin ya da TNF ile stimülasyon sırasında ise doku faktörü kandaki mononükleer hücreler ve vasküler endotel üzerinde hızla artar. DİK sırasında doku faktörüne dayalı trombin üretiminin sonucu sistemik fibrin oluşur ve antitrombin ve protein C sistemleri gibi trombin oluşumunu engelleyici mekanizmaların fonksiyonları yetersiz kalır (18).



Şekil 2.1 Koagülasyon ve fibrinolitik sistemin şematik gösterimi. DFYİ: Doku faktörü yolağı inhibitörü, AT III: Antitrombin III, PAİ 1: Plazminojen aktivatör inhibitör I

Antitrombin III koagülasyonun intrinsek, ekstrinsek ve ortak yollarını etkileme kapasitesi olan önemli bir koagülasyon regülatörüdür. Sepsiste tüketim artışı ve aktif nötrofillerden salınan elastazın parçalayıcı etkileri nedeniyle dolaşımdaki antitrombin düzeyleri azalır (4).

Sepsiste, pıhtılaşma faktörlerinin kullanımında artış ve koagülasyon - antikoagülasyon arasındaki dengede koagülasyon lehine bozulma olur. İnflamasyonda salınan mediyatörler trombosit sayısını ve aktivasyonunu artırır, doğal antikoagülan mekanizmaları baskılar, koagülasyon sistemini aktive eder ve fibrinolizi engellerler (Şekil 2.2). Benzer şekilde, koagülasyon sırasında trombositlerden salınan mediyatörler ve hücreler arasında kurulan bağlantılar inflamasyon yanıtını arttırabilir. Bu şekilde koagülasyon sisteminde sonuçta DİK oluşumuna neden olan kısır bir döngü oluşur (7).



Şekil 2.2: Sepsiste sitokin ilişkili mikrovasküler trombozun patojen yolları

Sepsiste DİK gelişmesinde koagülasyon yollarının aktivasyonunun etkisi kadar fibrinolitik sistemin engellenmesi de önemlidir. PAI-1 düzeyleri sepsiste inflamasyona yanıt olarak önemli miktarda yükselir. PAI-1 düzeylerinin artması sonucu plazminojen aktif formu olan plazmine dönüştürülemez ve fibrinin yıkılamamasına bağlı olarak yaygın mikrovasküler trombus ve buna bağlı organ yetersizliği gelişir (19).

2.4. Fibrinolitik/Fibrinojenolitik Tedavide Deneysel Yaklaşımlar

Etki mekanizmalarındaki farklılık temel alındığında fibrinolitik / fibrinojenolitik ajanlar iki ana grupta incelenebilir (20):

1. Plazminojen aktivasyonu sağlayan ajanlar:

- **Plazminojen aktivatörleri:** t-PA (doku tipi plazminojen aktivatörü) veya u-PA (ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü) direkt olarak fibrinoliz yaptıkları gibi PAI-1'in trombotik etkilerini de azaltır. Bu etkileri ile özellikle klinikte trombolitik tedavide kullanılmaktadır (21,22). Ancak tedavi sırasında istenmeyen kanama riski yüksektir.

- **PAI-1 inhibitörleri:** Sepsiste gelişen DİK tedavisindeki etkinlikleri henüz araştırılmamış olsa da deneysel çalışmalarda gösterilmiş olan fibrinolitik, trombolitik ve antitrombotik etkileri gelecek yıllarda sepsis tedavisinde kullanılmaları açısından umut vericidir. Doku plazminojen

aktivatörünün etkisini artırır, endojen trombolizi hızlandırır ve trombüs oluşumunu azaltır (23).

2. Plazmin benzeri proteinler

▪ **Metaloproteinaz ve serin proteinazlar:** Yılan venomundan elde edilirler. Fibrinolizi, fibrinojenolizi arttırdıkları ve trombolitik tedavi sonrası tekrar trombüs gelişimini azalttıkları gösterilmiştir. Ancrod, alfimeprase, defribase ve hementin araştırmalarda etkinliği gösterilmiş proteinazlar arasındadır (24,25,26).

▪ **Mikrobia fibrinolitik enzimler:** Düşük maliyetleri ve yan etkilerinin azlığı nedeniyle yıllardır araştırmalara konu olan ajanlardır. Streptococcus hemolyticus'dan elde edilen Streptokinaz ve Staphylococcus aureus'dan elde edilen stafilokinaz trombolitik tedavide etkin olduğu gösterilmiş olan ajanlardır (27). Çeşitli bakteri, aktinomiçes, mantar ve alglerden elde edilen birçok fibrinolitik/fibrinojenolitik enzim bulunmaktadır. Basillerin geleneksel fermente yiyeceklerden fibrinolitik enzim elde edilmesini sağlayan farklı tipleri mevcut olsa da en iyi bilineni ve üretilmesini sağladığı enzimin (nattokinaz) etkisi in vivo/in vitro olarak gösterilmiş olanı Bacillus natto'dur (20)(Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1: Geleneksel besinlerde çeşitli basil tipleri ile elde edilen fibrinolitik / fibrinojenolitik enzimler

Mikroorganizma	Besinin adı	Enzimin adı
B. natto	Natto, Japan	Nattokinase, NK
B. amyloliquefaciens DC-4	Douchi, China	Subtilisin DFE
Bacillus sp. CK	Chungkook-jang, Korea	CK
Bacillus sp. DJ-4	Doen-jang, Korea	Subtilisin DJ-4
Bacillus sp. DJ-2	Doen-jang, Korea	bpDJ-2
Bacillus sp. KA38	Jeot-gal, Korea	Jeot-gal enzyme
B. subtilis QK02	Fermented soybean	QK-1 and QK-2
Bacillus firmus NA-1	Natto	–
B. subtilis IMR-NK1	Natto	–
Bacillus sp. KDO-13	Soybean paste, Korea	–

2.5. Nattokinaz

Haşlanmış soya fasülyesinin Bacillus subtilis natto kullanılarak fermente edilmesiyle elde edilir. Yerel adıyla Natto, Japonya'da farklı damak tadı nedeniyle 1000 yıldan uzun süredir yaygın olarak tüketilen geleneksel bir besin maddesidir. Halk arasında yorgunluğa ve beri-beri bulgularına karşı iyileştirici olduğuna ve kardiyovasküler hastalıkları, osteoporozu ve yaşlanmayı engellediğine inanılmaktadır (3). Nattonun fibrin pıhtılarını eritme yeteneği aynı zamanda enzimi izole eden ve

saflaştıran Sumi (28) tarafından gösterilmiş ve ismi Nattokinaz olarak bilimsel literatüre geçmiştir.

Nattokinaz 275 aminoasit rezidüsünden oluşan, molekül ağırlığı 27,7 kDa olan ve subtilinler ile yüksek moleküler benzerlik gösteren bir serin endopeptidazdır. Enzim pH=7-12 olan ortamlarda ve 50°C altında stabildir. Oluşturduğu fibrinolitik aktivite fenilmetilsülfonil florid, diizopropilflorofosfat veya E-64 ile geri dönüşümsüz olarak engellenebilir (29).

Fibrinolitik aktivitesinin plazminden yaklaşık 4 kat daha fazla olduğu pıhtı erime analizlerinde gösterilmiştir (31). İnsan çalışmalarında, fibrinolitik aktiviteyi en az 2 kat artırdığı ve plazma doku plazminojen aktivatör ve fibrin yıkım ürünleri seviyelerini yükselttiği gösterilmiştir (32). Fibrin üzerine doğrudan etkisine ek olarak plazminojenin plazmine dönüşmesini hızlandırdığı ve reaktif alanın sınırlı proteolizi ile PAİ-1'i inaktive ettiği gösterilmiştir (2). Yapılan deneysel çalışmalarda, kontroller ile kıyaslandığında enzimin deney hayvanlarında kanamaya yatkınlığı arttırmadığı bildirilmiştir (33).

Büyük molekülü proteinlerin sindirim sisteminde spesifik olmayan parçalanmaya uğramaları bu proteinlerin inaktif hale gelmelerine neden olur. Ancak, yaklaşık 27 kDalton büyüklüğe sahip olan Nattokinaz'ın ratlarda gastrointestinal yoldan emilime uğradığı ve enzimin duodenuma verilmesi sonrası yarım saat içerisinde plazmadaki fibrinojene bağlanarak fibrinojenin parçalara ayrılmasına neden olduğu bilinmektedir (34). Köpeklere oral yoldan verilmesi sonrası deneysel olarak oluşturulmuş trombusün eritildiği anjiyografik olarak gösterilmiştir (35).

2.6. Kanın Akışkanlık Özellikleri

Kan dokusunun akışkanlığı temel olarak kanın hücresel elemanlarının hacimsel oranına ve reolojik özelliklerine (örneğin; plazma viskozitesi, eritrosit agregasyonu ve eritrosit deformabilitesi) bağlıdır. Ancak, kan akışı üzerine etkili olan kan dokusunun reolojik davranışları akımın meydana geldiği damarın boyutlarına ve akım koşullarına göre değişmektedir. Kan akımı ve doku perfüzyon değişiklikleri görülen durumlarda, vasküler kontrol mekanizmaları aracılığıyla damar çapı değiştirilerek kompensasyon sağlanır. Ancak damar yapısı veya vazomotor yanıt mekanizmaları patolojik süreç nedeniyle bozulmuşsa (aterosklerozis, sepsis gibi) bu kompensasyon gerçekleştirilemeyebilir (36).

2.6.1. Plazma ve Kan Viskozitesi

Plazma kandaki hücresel elemanlar için taşıyıcı görevi yaptığından, plazmanın akışkanlığında bir değişiklik olması doğrudan kan viskozitesine yansır. Viskozite kayma geriliminin kayma hızına oranı olarak tanımlanabilir (Şekil 2.3). Normal plazma viskozitesi 37°C 'de 1.10-1.35 centipoise (cp) arasında bir değere sahiptir (37, 38).

Ancak, akut faz reaksiyonu gelişen fizyopatolojik durumlarda başlıca fibrinojen ve plazma proteinleri artışına bağlı olarak plazma viskozitesi artar (39). Sepsisin geç dönemlerinde görüldüğü gibi hipodinamik dolaşım durumlarında hücreler üzerinde etkili olan kayma gerilimi azaldıkça eritrositlerin şekil değiştirme yeteneği azalır, agregasyon artar ve rulo oluşumu gözlenir. Böylece kan viskozitesi artar (5).

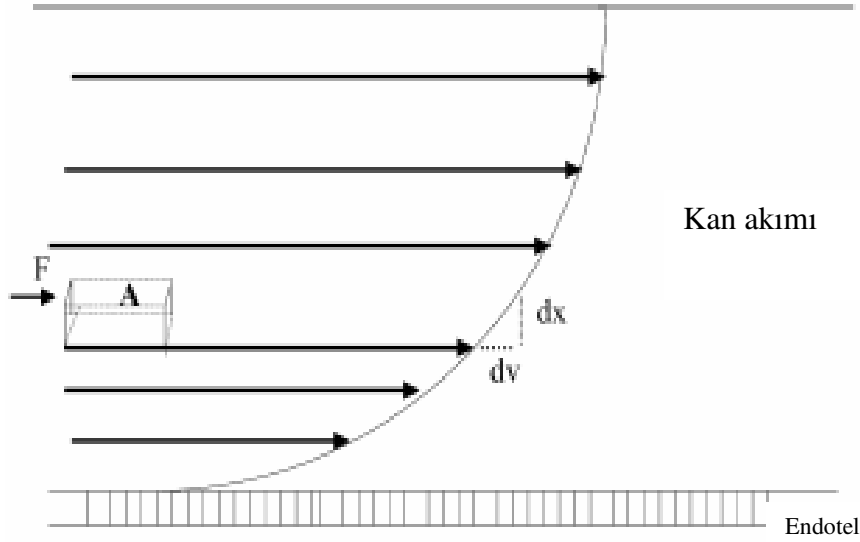
2.6.2. Eritrosit Agregasyonu

Hidrodinamik kuvvetler küçüldükçe, eritrositler geniş diskoid yüzeylerinden birbirlerine yaklaşarak kümelenir ve eritrosit agregatlarını oluşturur (40). Kan akışkanlığının yeterli olduğu durumlarda eritrositler plazma içerisinde bir sıvı damlası gibi davranırken, akım hızının yavaşlaması halinde eritrosit agregatları oluşur. Eritrosit agregatları kan akımı içerisinde sıvı tabakaları arasındaki sürtünme kuvvetini ve dolaylı olarak kanın viskozitesini artırır (41). Eritrosit agregasyonu plazma ve eritrosit özelliklerine paralel olarak değişkenlik gösterir. Plazma fibrinojen konsantrasyonu eritrosit agregasyonu üzerinde çok önemli rol oynar (42, 43). Hematokrit değeri ve eritrosit membranının fizikokimyasal özelliklerindeki değişimlere ek olarak eritrositlerin deformabilitesi de eritrosit agregasyonunu etkiler (44, 45).

Sepsiste akut faz proteinleri miktarındaki artış eritrosit agregasyonunda da artışa neden olur. Eritrosit agregasyonunda artış olması sepsiste sık rastlanan doku perfüzyon bozukluklarına neden olabilir. Eritrosit agregatları sıklıkla sistemik dolaşımda düşük kayma hızına sahip bölgelerde (Örneğin; venöz sistem) oluşur ve kan viskozitesini ve kan akımına karşı direnci artırır. Kan akımına karşı direncin artması geç dönem sepsiste görülen hipodinamik kan akımına neden olarak doku perfüzyonunu daha da kötüleştirir. Doku perfüzyonunun kötüleşmesi sonucu eritrosit hasarı daha belirgin hale gelir ve buna bağlı gelişen eritrosit agregasyonu ve deformabilite artışı hemoreolojik kısır döngüye neden olabilir (5,46).

2.6.3. Eritrosit Deformabilitesi

Eritrositlerin kan akımı sırasında kendine uygulanan kuvvetlere yanıt olarak şekil değiştirebilme yetenekleri olarak tanımlanan deformabilite eritrositlerin kendi çaplarından daha küçük kapillerlerden geçebilmelerini sağlar. Bu şekilde solunum gazlarının eritrositlerce taşınması ve dokularda gaz değişimi yapılması mümkün olur (47, 48). Bikonkav disk şeklinde olan eritrositler küresel bir yapıya dönüştükçe şekil değiştirebilme yetenekleri azalır. Eritrosit deformabilitesini eritrosit geometrisi, sitoplazma viskozitesi ve eritrosit membranının reolojik özellikleri belirler (47, 48, 49, 50). İç ortamın ozmolaritesinde ve hücre içi kalsiyum değişikliklerinde, hemoglobinopati ile birlikte seyreden hastalıklarda ve dolaşım sistemini ilgilendiren patolojiler başta olmak üzere çeşitli klinik tablolarda eritrosit deformabilitesi değişmektedir (50).



Şekil 2.3: Viskoziteyi belirleyen faktörler (5)

$$\text{Viskozite} = \frac{\text{Kayma gerilimi}}{\text{Kayma oranı}} = \frac{F/A}{dv/dx}$$

F= Akım kuvveti

A= Kayan sıvının birim alanı

dv= Komşu sıvı tabakaları arasında kayma hızı farkı

dx= Sıvı tabakaları arasındaki mesafe

Deneysel sepsis modellerinde eritrositlerin şekil değiştirebilme yeteneğinin bozulduğu bilinmektedir. Sepsis sırasında ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri eritrositlerin hücre içi proteolizisini, membran-lipit peroksidasyonunu ve nitrik oksit üretimini artırır. Eritrositlerde hücre içi serbest Ca^{+2} miktarı artar, ATP rezervi azalır ve 2,3 difosfogliserat konsantrasyonlarında değişiklikler oluşur. Bu değişiklikler sonucunda karbonhidrat içeriği ve membran pompa değişiklikleri ile karakterize eritrosit membran bozuklukları ve eritrosit deformabilitesinde azalma oluşur (5).

2.7. Hipotez

Bu çalışmada test edilmesi planlanan hipotezler şunlardır:

- Nattokinaz; fibrinojenolitik ve fibrinolitik aktiviteyi arttırması yoluyla, sepsisli hastalarda sık gözlenen serum fibrinojen artışını, eritrosit agregasyonu, serum/kan viskozite artışını baskılar
- Nattokinaz; fibrinolitik, antiagregan ve viskozite azaltıcı etkileri nedeniyle dolaylı olarak sepsise bağlı mortaliteyi azaltır

Şıçanlarda çekal ligasyon ve delme ile oluşturulan intraabdominal sepsis öncesi 7 gün boyunca intragastrik nattokinaz verilmesinin plazma fibrinojen seviyesi, kan ve plazma viskozitesi, eritrosit agregasyonu, eritrosit deformabilitesi ve sepsise bağlı mortalite üzerine etkileri incelenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Protokolü

3.1.1. Deneylerin Tanımlanması

Bu deneysel çalışmada; Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesinde yetiştirilen 100 tane 180–250 gram ağırlığında Wistar tipi genç dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlardan 60 tanesi, 0.6 mg/gün dozda nattokinaz uygulanarak biyokimyasal ve reolojik parametrelerin analizi amacıyla (Deney 1), 20 tanesi 6 mg/gün dozda nattokinaz uygulanarak biyokimyasal ve reolojik parametrelerin analizi amacıyla (Deney 2), 20 tanesi ise hayatta kalma analizi yapılması amacıyla farklı üç deneyde kullanıldı (Deney 3).

Deney 1:

Düşük dozda (0.6 mg/gün) nattokinaz uygulanarak **biyokimyasal ve reolojik analizlerin** yapıldığı ilk deneyde 60 sıçan her grupta 10 adet sıçan bulunacak şekilde 6 gruba ayrıldı:

1. Kontrol grubu (K)
2. Laparotomi (Sham) grubu (Lap)
3. Çekal ligasyon grubu (ÇL)
4. Nattokinaz kontrol grubu (Nat)
5. Nattokinaz ve laparotomi grubu (Nat+Lap)
6. Nattokinaz ve çekal ligasyon grubu (Nat+ÇL)

Deney 2:

Yüksek dozda (6 mg/gün) nattokinaz uygulanarak **biyokimyasal ve reolojik analizlerin** yapıldığı ikinci deneyde 20 sıçan her grupta 10 adet sıçan bulunacak şekilde 2 gruba ayrıldı (Nat+ÇL grubu ve ÇL grubu) ve bu çalışmanın kontrol grubu için ilk deneyin Lap grubunun verileri kullanıldı. Sonuçta ikinci deneyde 3 farklı grubun verileri değerlendirildi:

1. Laparotomi (Sham) grubu (Lap)
2. Nattokinaz ve çekal ligasyon grubu (Nat+ÇL)
3. Çekal ligasyon grubu (ÇL)

Deney 3:

Hayatta kalma analizi yapılan üçüncü deneyde ise kalan 20 sıçan her grupta 10 adet sıçan bulunacak şekilde 2 gruba ayrıldı:

1. Nattokinaz ve çekal ligasyon grubu (Nat+ÇL)
2. Çekal ligasyon grubu (ÇL)

3.1.2. Deneylerde Yeralan Gruplarda Yapılan Uygulamaların Tanımlanması

3.1.2.1. Deney 1 ve Deney 2’de Yeralan Gruplarda Yapılan Uygulamalar

Tüm gruplarda sıçanlara 1 hafta boyunca beslenme sondası yardımı ile 12 saate bir kez 1 ml gavaj (nattokinaz içeren veya içermeyen zeytinyağı) uygulandı. Hayvanlar bu süre içerisinde standart sıçan yemi ile beslendi, sıvı kısıtlaması yapılmadı ve 12 saatlik diurnal ışık uygulandı. Hematolojik ve reolojik analiz deney gruplarında yapılan uygulamalar aşağıda belirtilmiştir:

1. Kontrol grubu (K):

K grubuna dahil edilen 10 adet sıçana 1 hafta boyunca beslenme sondası ile günde iki kez 1 ml nattokinaz içermeyen zeytin yağı verildi. Bir haftanın sonunda zeytin yağı gavajı sonlandırıldı ve hiçbir cerrahi işlem uygulanmadı. Son gavajdan 18 saat sonra batin açılarak abdominal aortadan kan alınması yoluyla sıçanlar feda edildi.

2. Laparotomi (Sham) grubu (Lap):

Lap grubuna dahil edilen 10 adet sıçana 1 hafta boyunca beslenme sondası ile günde iki kez 1 ml nattokinaz içermeyen zeytin yağı verildi. Bir haftanın sonunda son gavaj uygulamasını takiben eter anestezisi altında laparotomi uygulandı. Barsaklar explore edildi ve çekal ligasyon veya başka bir cerrahi müdahale yapılmadan batin kapatıldı. Laparatomiden 18 saat sonra eter anestezisi altında sıçanlara tekrar laparotomi uygulandı ve abdominal aortadan kan alınması yoluyla sıçanlar feda edildi.

3. Çekal ligasyon grubu (ÇL):

ÇL grubuna dahil edilen 10 adet sıçana 1 hafta boyunca beslenme sondası ile günde iki kez 1 ml nattokinaz içermeyen zeytin yağı verildi. Bir haftanın sonunda son gavaj uygulamasını takiben eter anestezisi altında laparotomi ile çekal ligasyon ve delme (ÇLD) uygulandı. Laparatomiden 18 saat sonra eter anestezisi altında sıçanlara tekrar laparotomi uygulandı ve abdominal aortadan kan alınması yoluyla sıçanlar feda edildi.

4. Nattokinaz kontrol grubu (Nat):

Nat grubuna dahil edilen 10 adet sıçana 1 hafta boyunca beslenme sondası ile günde iki kez 1 ml nattokinaz içeren zeytin yağı verildi. Bir haftanın sonunda zeytin yağı gavajı sonlandırıldı ve hiçbir cerrahi işlem uygulanmadı. Son gavajdan 18 saat sonra batin açılarak abdominal aortadan kan alınması yoluyla sıçanlar feda edildi.

5. Nattokinaz ve laparotomi grubu (Nat+Lap)

Nat+Lap grubuna dahil edilen 10 adet sıçana 1 hafta boyunca beslenme sondası ile günde iki kez 1 ml nattokinaz içeren zeytin yağı verildi. Bir haftanın sonunda son gavaj uygulamasını takiben eter anestezisi altında laparotomi uygulandı. Barsaklar explore edildi ve çekal ligasyon veya başka bir cerrahi müdahale yapılmadan batin kapatıldı. Laparatomiden 18 saat sonra eter anestezisi altında sıçanlara tekrar laparotomi uygulandı ve abdominal aortadan kan alınması yoluyla sıçanlar feda edildi.

6. Nattokinaz ve çekal ligasyon grubu (Nat+ÇL)

Nat+ÇL grubuna dahil edilen 10 adet sıçana 1 hafta boyunca beslenme sondası ile günde iki kez 1 ml nattokinaz içeren zeytin yağı verildi. Bir haftanın sonunda son gavaj uygulamasını takiben eter anestezisi altında laparotomi ile ÇLD uygulandı. Laparatomiden 18 saat sonra eter anestezisi altında sıçanlara tekrar laparotomi uygulandı ve abdominal aortadan kan alınması yoluyla sıçanlar feda edildi.

3.1.2.2. Deney 3’de Yeralan Gruplarda Yapılan Uygulamalar

Tüm gruplarda sıçanlara 1 hafta boyunca beslenme sondası yardımı ile 12 saate bir kez 1 ml gavaj (6 mg/gün nattokinaz içeren veya içermeyen zeytinyağı) uygulandı. Hayvanlar bu süre içerisinde standart sıçan yemi ile beslendi, sıvı kısıtlaması yapılmadı ve 12 saatlik diurnal ışık uygulandı. Hayatta kalma analizi deney gruplarında yapılan uygulamalar aşağıda belirtilmiştir:

1. Nattokinaz ve çekal ligasyon grubu (Nat+ÇL)

Nat+ÇL grubuna dahil edilen 10 adet sıçana 1 hafta boyunca beslenme sondası ile günde iki kez 1 ml nattokinaz içeren zeytin yağı verildi. Bir haftanın sonunda son gavaj uygulamasını takiben eter anestezisi altında laparotomi ile çekal ÇLD uygulandı. Gözlem sürecine başlandı.

2. Çekal ligasyon grubu (ÇL)

ÇL grubuna dahil edilen 10 adet sıçana 1 hafta boyunca beslenme sondası ile günde iki kez 1 ml nattokinaz içermeyen zeytin yağı verildi. Bir haftanın sonunda son gavaj uygulamasını takiben eter anestezisi altında laparotomi ile çekal ligasyon ve delme uygulandı. Gözlem sürecine başlandı.

3.2. Deneysel Sepsis Modeli Oluşturulması

Deneysel sepsis modeli oluşturulması amacıyla hayvanlara eter ile anestezi uygulandı. Tüm sıçanların abdominal bölgesi traş edildi ve betadine solüsyonu ile boyandı. Steril cerrahi teknik kullanılarak orta hatta yaklaşık 2 cm uzunluğunda insizyon yapıldı ve çekum eksplere edildi. Çekum ilioçekal bileşkenin hemen distalinden intestinal obstrüksiyon oluşturmayacak şekilde 3-0 ipek ile bağlandı ve antimezenterik yüzeyinden 2 kez 18-G iğne ile delindi. Çekum deliklere doğru sıvazlanarak bir miktar feçesin deliklerden dışarıya sızması sağlandı. İşlemin ardından çekum tekrar periton boşluğuna yerleştirildi ve insizyon 3-0 ipek ile iki tabaka halinde kapatıldı. Laparotomi uygulaması sonrası dehidratasyonun engellenmesi amacıyla sıçanlara 2 ml/100gram vücut ağırlığı izotonik NaCl subkutan yolla uygulandı. Postoperatif ağrı kontrolü için tramadolol HCl uygulandı.

3.3. Hayatta Kalmanın Değerlendirilmesi

ÇLD uygulanması sonrası hayatta kalma sürelerinin analizi için sıçanlar ilk 24 saatte sürekli, 24–72 saatler arasında 4 saatte bir kez, 3–7 günler arasında ise 8 saatte bir kez gözlemlendi. Anestezi etkilerinin geçmesinin ardından intraabdominal sepsis gelişmesi sıçanlarda letarji gelişmesi, fiziksel aktivitede azalma, taşikardi, solunum paterninde bozulma gibi objektif bulgularla değerlendirildi.

3.4. Biyokimyasal Parametreler

İlk laparatomiden 18 saat sonra eter anestezisi altında sıçanlara tekrar laparotomi uygulandı ve ÇLD uygulanan gruplarda intraabdominal sepsis gelişmesi çekal ödem, distansiyon ve nekroz gelişmesi, periton içerisinde bol miktarda serbest sıvı tespit edilmesi ile doğrulandı. Abdominal aortadan alınan kan D-dimer ve fibrinojen plazma düzeyi ölçümleri için %3.2 sodyum sitrat (Greiner Bio-One /VACUETTE^R) içeren tüpe ve CRP ve TNF- α serum düzeyleri ölçümü için serum separator jel (Greiner Bio-One /VACUETTE^R) içeren tüpe koyuldu. Her iki tüpe koyulan kanlar 30 dakika içerisinde 4000 devirde 4 dakika santrifüj edilerek serum veya plazmaları ayrıldı ve - 30°C'de saklandı. Analiz öncesi eritilerek biyokimyasal ölçümler yapıldı.

3.4.1. Plazma Fibrinojen Düzeyi Ölçümü

Fibrinojen düzeyi modifiye Clauss metodu ile Multifibren U (Dade Behring Inc. Newark, DE 19714 USA) kitleri kullanılarak Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarında ölçülmüştür.

3.4.2. C-Reaktif Protein Düzeyi Ölçümü

Plazma C-Reaktif protein düzeyi immünoturbidimetrik yöntem ile in vitro kantitatif tayini CRPLX kitleri ve Roche / Hitachi analizörleri kullanılarak Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarında ölçülmüştür.

3.4.3. D-Dimer Düzeyi Ölçümü

Plazmada çapraz bağlı fibrin oluşumunun immünoturbidimetrik yöntem ile kantitatif değerlendirilmesi D-Dimer Plus (Dade Behring Inc. Newark, DE 19714 USA) kitleri kullanılarak Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarında ölçülmüştür.

3.4.4. TNF-alfa Düzeyi Ölçümü

Plazmada TNF-alfa düzeyi TNF-alfa Biyosource/96test/EIA kitleri ve ELISA yöntemi kullanılarak Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarında ölçülmüştür.

3.5. Reolojik Parametreler

Sıçanların abdominal aortasından alınan kandan reolojik analiz içi gerekli miktarda kan NH (Sodyum heparin) 170 I.U (BD Vacutainer Systems, Preanalytical Solutions Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK) içeren tüplere koyuldu ve bekletilmeden analiz edildi.

3.5.1. Tam Kan Viskozitesi

Tam kan viskozitesi farklı kayma hızlarında Rheolog (Rheologics, Exton, PA) viskometre ile Fizyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında ölçüldü. Bu viskometre in vivo koşulları taklit edecek şekilde biyolojik olarak geçimli olan bir madde ile kaplanmış, ısı kontrollü kapalı bir sistemde kanın analizini sağlar. Kan U şeklindeki kapiller içine alındıktan sonra bir sütun içerisinde toplanır. Ardından kanın yer çekimi doğrultusunda her iki kolonda dengelenmesine izin verilir. Kan akımı başlangıçta hızlıdır ancak her iki kolonda bulunan kan seviyesi birbirine yaklaşına

kadar geçen süre içerisinde giderek yavaşlar. kan akımı sırasında sistem belirlenmiş bir zaman dilimi içerisinde (3 dakika) iki kolondaki kanın yüksekliğini kaydeder.

Akım hızı (kolonlardaki kanın yüksekliğindeki değişim hızı ile belirlenir) kapiller tüp boyunca düşen basınç ile doğrudan orantılıdır ve akım hızından yola çıkarak kayma hızı ile viskozite matematiksel olarak sisteme irtibatlı bir bilgisayar yardımıyla hesaplanır (38). Tam kan viskozitesi ölçümleri 37°C sıcaklıkta, 1 – 1000 sn^{-1} kayma hızı aralığında ölçüldü.

3.5.2. Plazma Viskozitesi

Plazma viskozitesi, Wells-Brookfield “cone-plate” rotasyonel viskozimetre kullanılarak, 37 °C sıcaklıkta ve 1500 sn^{-1} kayma hızında, Fizyoloji Anabilim Dalına ait Hemoreoloji Laboratuvarında ölçüldü.

3.5.3. Eritrosit Agregasyonu

Eritrosit agregasyonu Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında geliştirilmiş olan fotometrik agregometre kullanılarak ölçülmüştür. Bilgisayar kontrollü bu cihaz aralarında 0.3 mm mesafe bulunan, birbirine paralel iki cam plaka ve bunlardan birisini bilgisayar tarafından belirlenen hızda döndüren bir adet motordan oluşmaktadır. Bu iki cam plaka arasına yerleştirilen kan örneğine bir diyot (LED) tarafından gönderilen infrared ışık demetinin kan örneğinin diğer tarafındaki fotosensör tarafından algılanıp amplifikatör sistemi ve analog/digital çevirici yardımıyla bilgisayara aktarılmasıyla ışık geçirgenliği zamana karşı kaydedilmiştir.

Ölçümün başlangıcında cam plakalardan birisi döndürülerek, kan örneği ölçüm noktasında 500 sn^{-1} kayma hızında 10 saniye hareket ettirilmiştir. Kan örneği içerisindeki eritrosit agregatlarını parçalayan (disagregasyon) bu hareketi izleyen ani bir durma sonrasında kan örneğinin ışık geçirgenliği 10 saniye süresince bilgisayar tarafından kaydedilmiştir. Kayma kuvvetlerinin ortadan kaldırılmasından sonra ortaya çıkan eritrosit agregasyonu sırasındaki ışık geçirgenliği değişikliğinin zaman içindeki seyri izlenerek, agregasyonun büyüklüğü (derecesi) ve dinamiği saptanabilir. Bilgisayar, ışık geçirgenliği-zaman eğrilerinin altında kalan alanı hesaplayarak, agregasyon derecesini yansıtan birimsiz bir agregasyon indeksi sağlamaktadır.

Eritrosit agregasyonu, otolog plazma içinde veya agregasyon için standart bir süspansiyon ortamı olarak kullanılan %1'lik Dextran 500 (MW: 500kD; Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) içinde, 37°C sıcaklıkta ölçülmüştür. Ölçümlerde kullanılan örneklerin hematokrit değeri 0.4 g/L'ye ayarlanmıştır.

3.5.4. Eritrosit Deformabilitesi

Eritrosit deformabilitesi bir ektasitometre (LORRCA, RR Mechatronics, Hoorn, The Netherlands) kullanılarak, çeşitli sıvı kayma kuvvetlerinde lazer difraksiyon analizi ile değerlendirildi. Eritrositler, izotonik fosfat tamponu (PDF) ile konsantrasyonu %5, viskozitesi ise 24cp olacak şekilde hazırlanmış PVP-360 (polivinylpyrrolidone, Sigma, St. Louis, MO, USA) çözeltisi içinde yaklaşık 1/200 dilüsyonda süspansiyon haline getirildi. Bu süspansiyonun yaklaşık 1 ml'si aralarında

0.3 mm boşluk kalacak şekilde birbirine uyan 2 cam silindirden oluşan bir viskometri sistemine yerleştirildi. İki cam silindirin arasındaki boşluğa doldurulan süspansiyon dışındaki cam silindirin sistemi kontrol eden bilgisayar tarafından uygun kayma kuvvetlerini oluşturmak üzere hesaplanan bir hızla döndürülmesiyle bu kuvvetlerin etkisi altında bırakıldı. Belirlenen aralıktaki kayma kuvvetlerini oluşturacak dönme hızları bilgisayar tarafından izotonik fosfat tamponu-PVP çözeltisinin viskozitesi de dikkate alınarak hesaplandı. Bu sırada sabit silindirin içinde yer alan bir lazer kaynağından çıkan bir ışın eritrosit süspansiyonuna ulaşmakta ve sonra bir ekran üzerine yansıyan difraksiyon paterni süspansiyondaki eritrositlerin şeklini ve dönme hareketlerinin yarattığı akıma orientasyonlarını yansıtmaktadır. Artan kayma kuvvetlerine paralel olarak, dairesel bir formdan elipsoid forma dönüşümün derecesi ile eritrositlerin şekil değiştirme yetenekleri (deformabilitesi) arasında doğru orantı vardır. Elipsoid difraksiyon paterninin uzun (a) ve kısa eksenlerinin (b) uzunluklarının bilgisayar tarafından saptanmasıyla $EI=A-B/A+B$ şeklinde bir elongasyon indeksi (EI) hesaplandı. Ölçümler 37°C 'de yapıldı. EI değerleri 9 kayma stresi arasında (0.3-30Pa) ölçüldü. Bu değerler kullanılarak her örnek için maksimum elongasyon indeksinin yarısı kadar şekil değiştirmeye neden olan kayma kuvveti ($SS_{1/2}$) LineaWeaver-Burke analizi uygulanarak hesaplandı.

3.6. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizde GraphPad Prism (3.cü sürüm) kullanıldı. Kan ve plazma viskozitesi, eritrosit agregasyonu ve deformabilitesi ile plazma fibrinojen ve serum TNF- α düzeyi verileri ortalama \pm standart hata olarak değerlendirildi. Gruplar arası biyokimyasal ve reolojik verilerde gruplar arası farkların ikili karşılaştırılması varyans analizi ile farklı kayma hızlarında kan viskozitesi değişikliklerinin karşılaştırılmasında ise tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi ile yapıldı. Gruplar arası farkların istatistiksel olarak değerlendirilmesinde Neuman-Keuls post hoc testi kullanıldı. Nat+ÇL ile ÇL grupları arasında hayatta kalmanın analizi Kaplan Meier testi ile yapıldı.

BULGULAR

4.1. Düşük Dozda (0.6 mg/gün) Nattokinaz Uygulanarak Yapılan Analizlerin (Deney 1) Sonuçları

4.1.1. Biyokimyasal Analiz Sonuçları

4.1.1.1. Fibrinojen Düzeyi Sonuçları

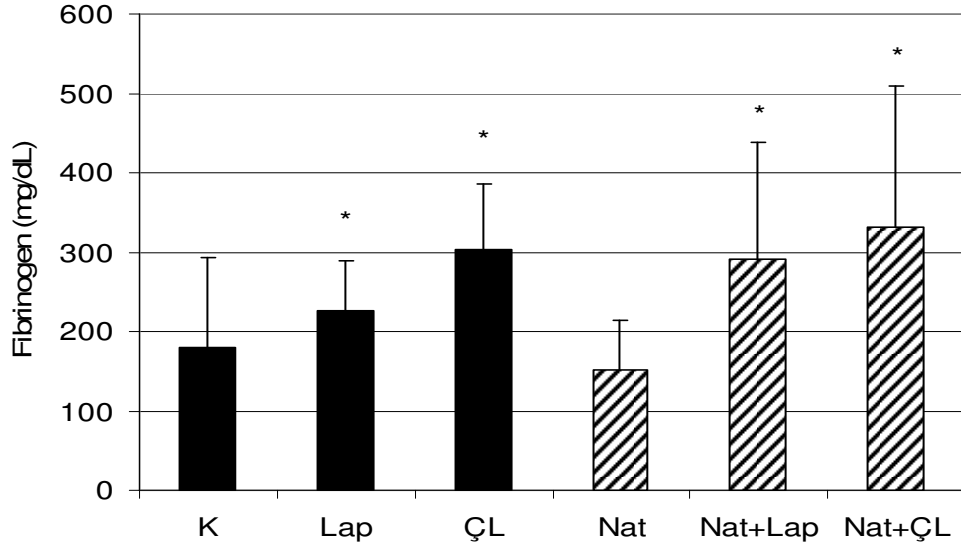
Plazma fibrinojen düzeyi ölçümleri ortalaması K grubunda 178.9 ± 114.8 mg/dl, Lap grubunda 226.9 ± 62.0 mg/dl, ÇL grubunda 302.3 ± 84.8 mg/dl, Nat grubunda 151.8 ± 63.3 mg/dl, Nat+Lap grubunda 290.8 ± 147.7 mg/dl ve Nat+ÇL grubunda 331.9 ± 178.9 mg/dl bulundu (Şekil 4.1.). K ve Nat grupları ile yalnızca laparotomi veya laparotomi ve ÇLD uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak önemli fark ($p < 0.05$) bulunmuş olmakla birlikte K ile Nat, ÇL ile Nat+ÇL veya Lap ile Nat+Lap grupları arasında önemli fark yoktur.

4.1.1.2. CRP ve D-Dimer Düzeyi Sonuçları

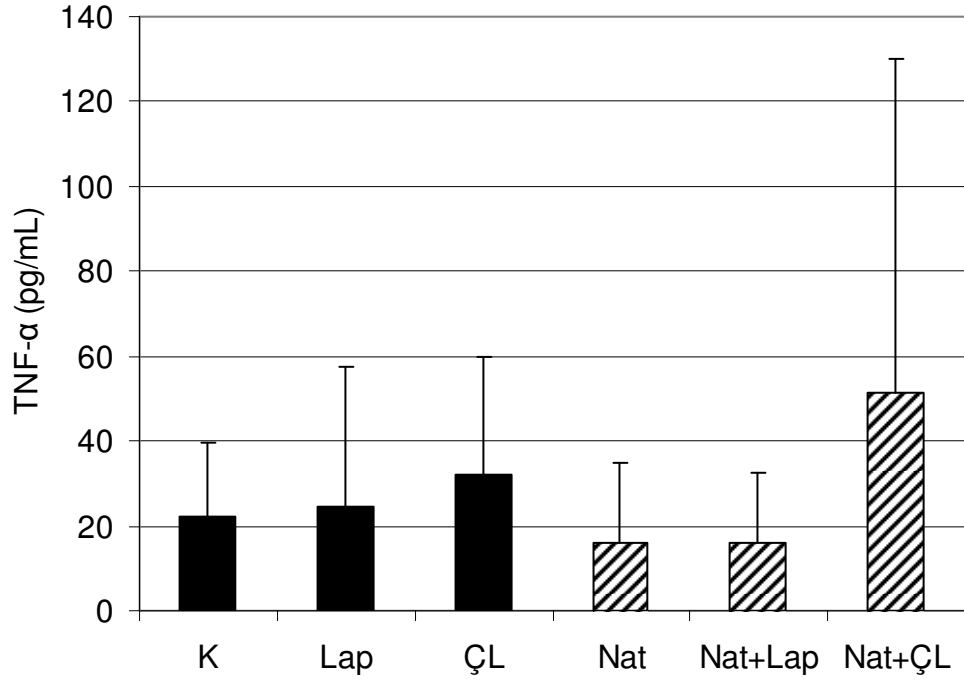
Plazma D-Dimer ve serum CRP ölçüm sonuçları, bu parametrelerin ölçümünde kullanılan kitlerin alt duyarlılık limitinden daha düşük bulunduğundan istatistiksel analize uygun bulunmamıştır.

4.1.1.3. TNF- α Düzeyi Sonuçları

TNF- α düzeyi ölçümleri ortalaması K grubunda 22.3 ± 17.2 pg/ml, Lap grubunda 24.6 ± 33.0 pg/ml, ÇL grubunda 32.0 ± 27.9 pg/ml, Nat grubunda 16.2 ± 18.9 pg/ml, Nat+Lap grubunda 16.2 ± 16.2 pg/ml ve Nat+ÇL grubunda 51.4 ± 78.9 pg/ml, bulunmuştur (Şekil 4.2.). Yapılan istatistik analizde gruplar arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunamamıştır.



Şekil 4.1. Düşük dozda (0.6 mg/gün) nattokinaz uygulanarak yapılan deneyde plazma fibrinojen düzeyi ortalamaları ve standart hataları gösterilmiştir. * $p < 0.05$ K gruplarından farkı gösterir. K ile Nat grubu, Lap ile Nat+Lap grubu, ÇL ile Nat+ÇL grubu arasında fark yoktur.



Şekil 4.2. Düşük dozda (0.6 mg/gün) nattokinaz uygulanarak yapılan deneyde plazma TNF- α düzeyleri ortalamaları ve standart hataları gösterilmiştir (n=9). Çalışmaya alınan grupların TNF- α ortalamaları arasında fark yoktur (p>0.05).

4.1.2. Reolojik Analiz Sonuçları

4.1.2.1. Tam Kan Viskozitesi Sonuçları

ÇLD sonrası sepsis gelişen sıçanlardan yetersiz miktarda kan alınabildiğinden bu gruplarda yapılan tam kan viskozitesi ölçüm sayısı istatistiksel analiz için yetersiz bulundu.

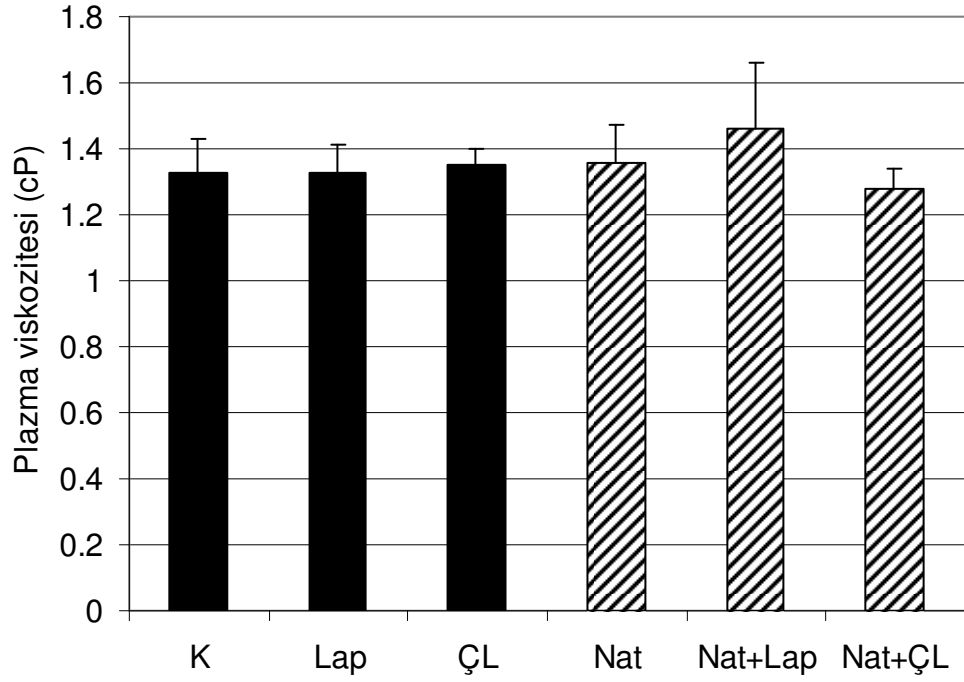
4.1.2.2. Plazma Viskozitesi Sonuçları

Grupların 1/1500 kayma hızında ölçülen plazma viskozitesi ortalamaları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadı (Şekil 4.3.).

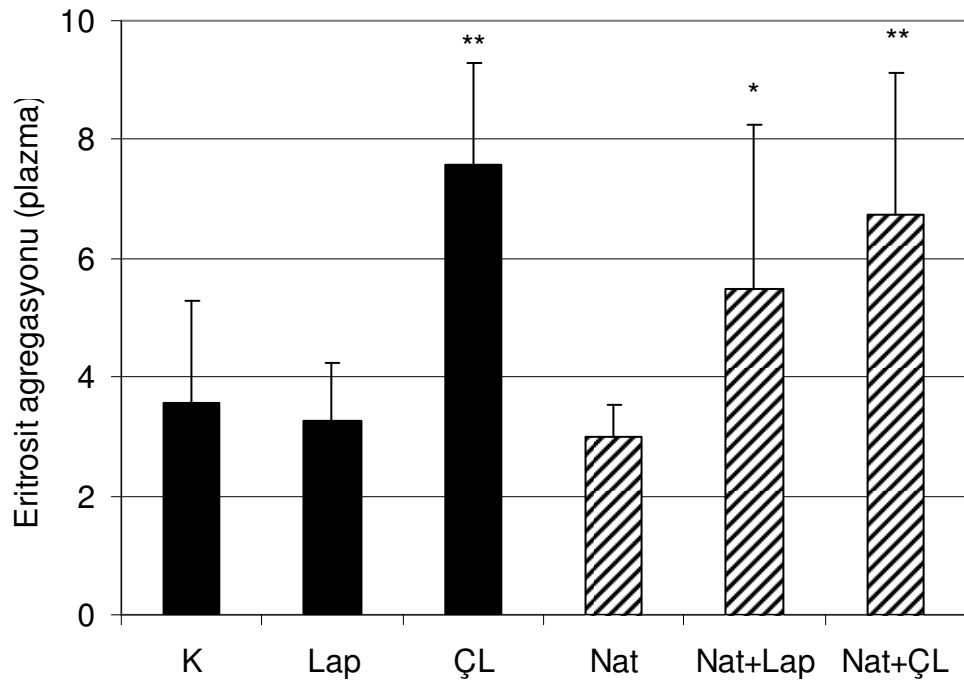
4.1.2.3. Eritrosit Agregasyonu Sonuçları

4.1.2.3.1. Otolog Plazma İçinde Agregasyon Sonuçları

Otolog plazma içinde yapılan eritrosit agregasyonu ölçümleri sonucunda, grupların M indeksi ortalamaları K grubunda 3.56 ± 1.74 , Lap grubunda 3.26 ± 0.97 , ÇL grubunda 7.56 ± 1.74 , Nat grubunda 2.98 ± 0.56 , Nat+Lap grubunda 5.49 ± 2.75 ve Nat+ÇL grubunda 6.75 ± 2.37 bulunmuştur (Şekil 4.4.). K grubuna ait M indeksi değeri ortalaması ile diğer gruplar karşılaştırıldığında; Nat+ÇL (p<0.001), Nat+Lap (p<0.05), ÇL (p<0.001) grupları ile olan fark önemli, Nat ve Lap grupları ile olan fark istatistiksel olarak önemsiz (p>0.05) bulunmuştur. Nat+Lap grubu ile Lap gruplarının M indeksi ortalamaları arasındaki fark önemli (p<0.05) bulunmakla birlikte Nat+ÇL grubu ile ÇL grubu arasında istatistiksel olarak önemli fark yoktur (p>0.05). Yalnızca laparotomi uygulanan gruplar ile ÇLD uygulanan gruplar karşılaştırıldığında M indeksi ortalamaları arasındaki fark önemlidir (p<0.05).



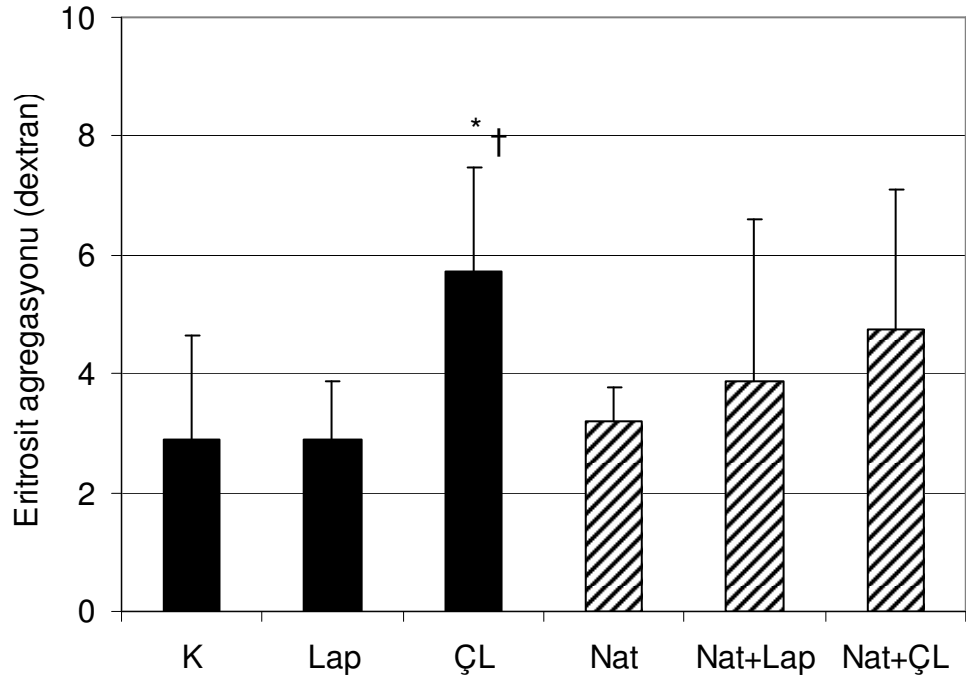
Şekil 4.3. Düşük dozda (0.6 mg/gün) nattokinaz uygulanarak yapılan deneyde plazma viskozitesi düzeyleri ortalamaları ve standart hataları gösterilmiştir. Çalışmaya alınan grupların plazma viskozite ortalamaları arasında fark yoktur ($p>0.05$).



Şekil 4.4. Düşük dozda (0.6 mg/gün) nattokinaz uygulanarak yapılan deneyde grupların otolog plazma içerisinde ölçülen eritrosit agregasyon indeksi (M) indeksi ortalamaları ve standart hataları gösterilmiştir. ** $p<0.01$, * $p<0.05$ K grubu ile farkı gösterir.

4.1.2.3.2. %5 Dekstran İçinde Agregasyon Sonuçları

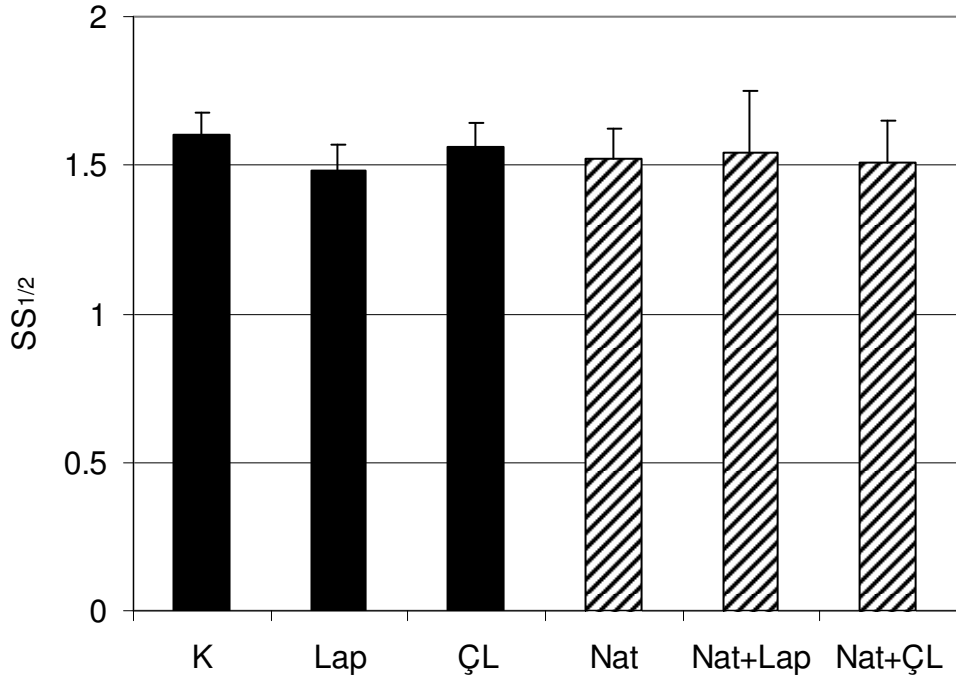
Yıkılmış eritrositlerin, standart agregasyon ortamı olarak kullanılan %1'lik dekstran 500 (MA: 500000 Dalton) çözeltisi içindeki süspansiyonunda yapılan ölçümlerin sonuçları Şekil 4.5.'de gösterildi. K grubu ile diğer gruplar karşılaştırıldığında yalnızca ÇL grubunun M indeksi ile olan fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.05$). ÇL grubu ile Nat, Lap, Nat+Lap grupları arasındaki fark da istatistiksel olarak önemli bulunmakla birlikte K ile Nat, ÇL ile Nat+ÇL veya Lap ile Nat+Lap gruplarının M indeksi ortalamaları arasında önemli fark yoktur ($p>0.05$).



Şekil 4.5. Düşük dozda (0.6 mg/gün) nattokinaz uygulanarak yapılan deneyde %1 Dekstran 500'ün PBS içerisindeki çözeltisinde ölçülen eritrosit agregasyonu (M) indeksleri ortalamaları ve standart hataları gösterilmiştir. * $p<0.05$ K grubu ile farkı, † $p<0.05$ Lap grubu ile farkı gösterir.

4.1.2.4. Eritrosit Deformabilitesi Değerlendirilmesi Sonuçları

Gruplardan elde edilen kan örnekleriyle yapılan ölçümlerde, farklı kayma kuvvetlerinde ölçülmüş deformabilite değerleri karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak önemli fark bulunmamıştır. Grupların $SS_{1/2}$ değerleri ortalamaları arasında da önemli fark yoktur (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. Düşük dozda (0.6 mg/gün) nattokinaz uygulanan deneyde gruplara ait maksimum elongasyon indeksinin yarısı kadar şekil değiştirmeye neden olan kayma kuvveti ($SS_{1/2}$) değerleri ortalaması ve standart hataları gösterilmiştir. Çalışmaya alınan grupların $SS_{1/2}$ ortalamaları arasında fark yoktur ($p>0.05$).

4.2. Yüksek Dozda (6 Mg/Gün) Nattokinaz Uygulanarak Yapılan Analizlerin (DENEY 2) Sonuçları

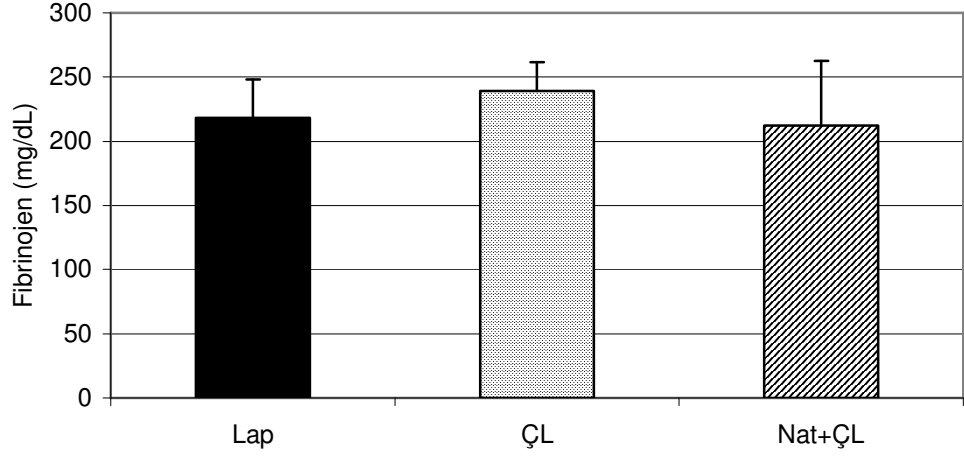
4.2.1. Fibrinojen düzeyi sonuçları

Yüksek dozda (6 mg/gün) nattokinaz uygulamasının etkilerinin araştırıldığı Deneysel 2'de sıçanların 27 tanesinden (her gruptan 9 sıçan) fibrinojen düzeyi bakılmasına yeterli olabilecek kan alınabildi. Plazma fibrinojen düzeyleri ortalamaları Lap grubunda 218.5 ± 29.6 mg/dl, ÇL grubunda 239.2 ± 22.3 mg/dl ve Nat+ÇL grubunda 212.5 ± 49.9 mg/dl bulundu (Şekil 4.7.). Nat+ÇL grubundaki sıçanlara ait fibrinojen düzeyi ortalaması Lap ve ÇL gruplarından düşük olmakla birlikte değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmadı ($p>0.05$).

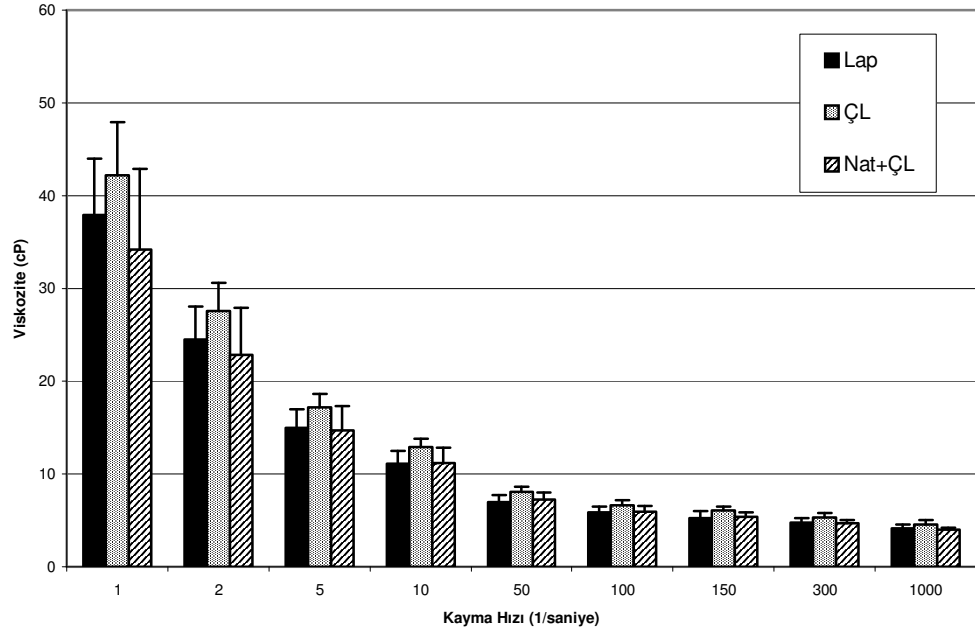
4.2.2. Tam Kan Viskozitesi Sonuçları

ÇLD sonrası sepsis gelişen sıçanların bazılarında yetersiz miktarda kan alınabildiğinden her gruptan 7 sıçanda tam kan viskoziteleri ölçülebildi. RheologTM ile farklı kayma hızlarında (1-100/saniye) yapılan kan viskozitesi ölçümlerine ait grafik Şekil 4.8' de gösterildi. Düşük kayma hızlarında (1-10 /saniye) Nat+ÇL grubunda yer alan sıçanların tam kan viskozitesi diğer gruplara göre daha düşük olmakla birlikte fark istatistiksel olarak önemli bulunmadı. Ancak, kayma hızlarının değişmesinin viskoziteye etkileri tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi ile karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark önemli bulundu ($p<0.05$). Kayma hızının azalmasıyla viskozite değişim hızı ÇL grubunda en yüksek Nat+ÇL grubunda ise en düşük bulundu. Benzer kayma hızlarında gruplar arası farkların ikili analizi

yapıldığında yalnızca Lap ve ÇL grupları arasında 10 ve 50/saniye kayma hızlarında önemli fark bulundu ($p<0.05$) ancak Nat+ÇL grubu ile diğer gruplar arasında önemli fark elde edilemedi ($p>0.05$).



Şekil 4.7. Yüksek dozda (6 mg/gün) nattokinaz uygulanarak yapılan deneyde plazma fibrinojen düzeyleri ortalamaları ve standart hataları gösterilmiştir (n=9). Grupların fibrinojen düzeyi ortalamaları arasında fark yoktur.



Şekil 4.8. Yüksek dozda (6 mg/gün) nattokinaz uygulanarak yapılan deneyde Lap, ÇL ve Nat+ÇL gruplarının farklı kayma hızlarında viskozite değişimleri gösterilmiştir. Benzer kayma hızlarında grupların viskozite değerleri arasında fark yoktur.

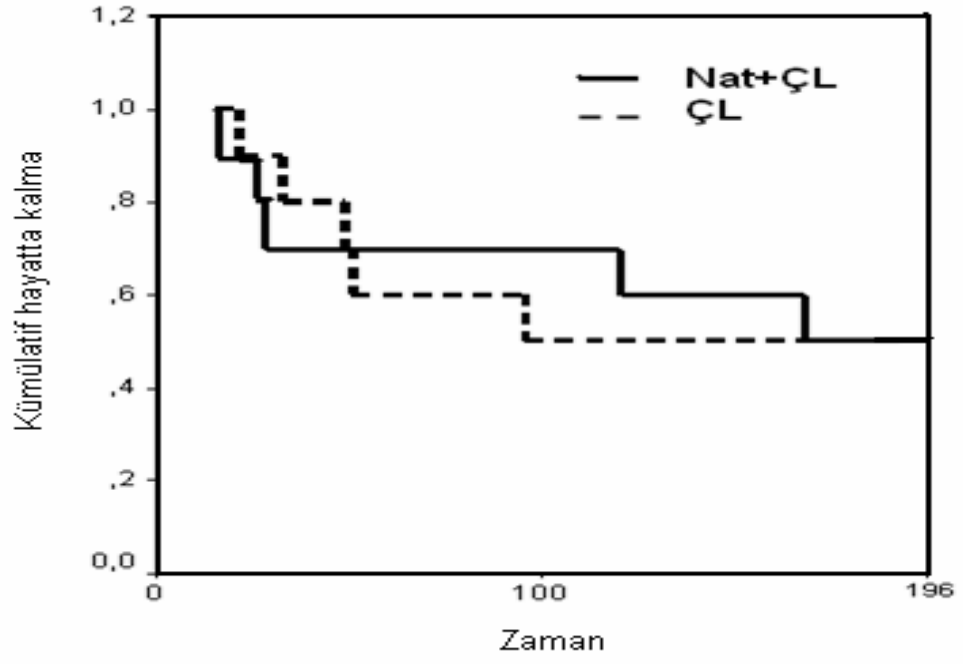
4.3. Hayatta Kalma Analizi Sonuçları

Çalışmada Nat+ÇL ile ÇL gruplarına dahil olan 20 sıçanın ÇLD operasyonu sonrası 196 saat süresince ölüm sıklığı ve hayatta kalma süreleri değerlendirildi (Çizelge 4.2.).

Nat+ÇL grubundaki sıçanların gözlem süresinin sonunda hayatta kalma oranı %50 ve ortalama hayatta kalma süresi 133.7 ± 24.0 saat olarak belirlendi. ÇL grubundaki sıçanların ise hayatta kalma oranı gözlem süresinin sonunda Nat+ÇL grubu ile benzer (%50) olmakla birlikte ortalama hayatta kalma süreleri 123.1 ± 23.7 saat bulundu. Yapılan Kaplan Meier yaşam süresi analizi sonucunda iki grup arasında istatistiksel olarak önemli fark yoktur (Şekil 4.9.).

Çizelge 4.2. Hayatta kalma analizi yapılan gruplar, ölüm sıklığı ve sıçanların ölüm saatleri gösterilmiştir.

GRUPLAR	NATTOKİNAZ ve ÇEKAL LİGASYON n=10	ÇEKAL LİGASYON n=10
Gözlem Süresi	196 saat	196 saat
Ölen sıçan sayısı	5	5
	Postoperatif ölüm zamanı (saat)	
1. sıçan	15	22
2. sıçan	28	33
3. sıçan	26	49
4. sıçan	120	51
5. sıçan	168	96



Şekil 4.9. Hayatta kalma analizi sonuçlarının Kaplan-Meier metodu ile karşılaştırılması gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Sepsis hastane ve yoğun bakım tedavilerinin gelişmesi ile birlikte sıklığı artan mortalitesi %28-50 arasında değişen bir sendromdur (51). Patofizyolojisinde intravasküler fibrin birikmesi önemli rol oynar (52). Mikrovasküler tromboz hasarlanmış dokunun tamir edilmesini ve sistemik dolaşımdaki bakterilerin dokulara difüzyonunun kısıtlanmasını hedefleyen bir savunma mekanizmasıdır. Ancak yaygın ve aşırı mikrotrombüs oluşması şiddetli doku iskemisi ve buna bağlı organ yetersizliklerine neden olur (53). Sepsiste gözlenen trombojenik durum monositlerde doku faktörünün ve vasküler endotel hücrelerinde PAİ-1 ekspresyonunun artmasına bağlıdır (52). Bu nedenle sepsise bağlı plazma PAİ-1 düzeyi artışının baskılanması tedavi hedefleri arasında yer almaktadır.

Bu çalışmada, nattokinazın fibrinolitik/fibrinojenolitik işlevlerinin sepsis modelinde eritrositlerin reolojik özellikleri, kanın akışkanlığı ve mortalite üzerine etkileri araştırılmıştır. Literatürde nattokinazın sepsiste gelişen DİK tedavisinde kullanılmasına ilişkin deneysel çalışma bulunmaması nedeniyle bu çalışmaya nattokinazın trombolitik amaçlı kullanıldığı çalışmalardan yola çıkarak 0.6 mg/gün nattokinaz uygulanması ile başlanmıştır (Deney 1). Bir haftalık nattokinaz uygulanması sonrası yapılan analiz sonucunda cerrahi girişim uygulanan tüm gruplarda fibrinojen düzeyi ortalaması kontrol gruplarından daha yüksek bulunmuştur. Akut faz reaktanı olarak bilinen fibrinojenin cerrahi stres ve inflamasyon sonrası artması beklenen bir bulgudur. Ancak nattokinaz ile beslenme uygulanmayan Lap ve ÇL grupları kendi kontrolleri olan Nat+Lap (Lap grubunun kontrolü) ve Nat+ÇL (ÇL grubunun kontrolü) grupları ile kıyaslandığında rakamsal olarak düşük fibrinojen düzeyine sahip olsalar da bu fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

İlk deneyde kullanılan 0.6 mg/gün nattokinaz uygulanması sonrası alınan kanlarda yapılan TNF- α analizi sonucu gruplar arasında istatistiksel olarak önemli fark tespit edilemedi. ÇLD uygulanan gruplarda TNF- α ortalamaları diğer gruplardan yüksek olmasına rağmen sonucun istatistiksel olarak önemli bulunmaması, tüm gruplarda standart hatanın çok yüksek olmasına neden olan bazı analiz sonuçlarından kaynaklanmış olabilir. Bu nedenle her grupta aşırı yüksek bulunan bir veri iptal edilmiş (n=9) olmasına rağmen, standart hata grupların çoğunda yüksek bulundu.

Kontrol gruplarına alınan sıçanların abdominal aortasından deney sonunda yaklaşık 6-8 ml kan alınabilmesine rağmen ÇLD yöntemi ile intraabdominal sepsis oluşturulan sıçanlardan ancak 3-5 ml kan alınabildi. Bu durumun sepsis sendromunun karakteristik özelliği olan vasküler yapılar dışına sıvı kaçışına bağlı olduğu düşünüldü. ÇLD uygulanan sıçanlardan az kan alınabilmesinin deney sonuçları açısından önemi, ilk deneyde bu gruplardan alınan kanın yetersizliği nedeniyle tam kan viskozite analizinin yapılamamış olmasıdır.

Deney 1’de kullanılan 0.6 mg/gün nattokinaz uygulanması sonrası gruplardan alınan kanların plazma viskoziteleri arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunmamıştır. Fibrinojen düzeyinin plazma viskozitesini belirleyen en önemli unsurlardan birisi olduğu ve bu deneyde plazma fibrinojen düzeylerinin benzer bulunduğu düşünülürse, gruplar arasında plazma viskoziteleri arasında fark bulunmaması beklenen bir sonuçtur. Sonuç olarak, nattokinazın plazma fibrinojen düzeyi ve plazma viskozitesi üzerine etkisi olmamıştır.

Plazma içindeki ve hücrel faktörlerdeki değişimi ortaya koymak üzere yapılan %5 Dextran içindeki agregasyon ölçümlerinde elde edilen bulgular birbirine yakındır. ÇLD uygulanan gruplarda eritrosit agregasyonu beklendiği gibi yüksek bulunmakla birlikte nattokinaz uygulanan gruplar kontrolleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli fark bulunmamıştır. Eritrosit deformabilitesi analizinde ise sonuçlar tüm gruplarda benzer bulunmuştur.

Nattokinazın eritrosit agregasyonu ve kan viskozitesi üzerine etkileri bir çalışmada in vitro ortamda araştırılmış ve enzim ile muamale sonucunda eritrosit agregasyonunda doz bağımlı azalma ve kan viskozitesinde özellikle düşük kayma hızlarında azalma olduğu bildirilmiştir (3). Deney 1’de bahsedilen bu çalışma ile uyumsuz olarak, nattokinaz uygulanan gruplarda eritrosit agregasyonundaki azalma istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Ayrıca, intraabdominal sepsis oluşturulan sıçanlardan yetersiz kan alınabilmesi nedeniyle kan viskozitesi ölçümü yapılamamış ancak, plazma viskozitesi sonuçlarında da gruplar arasında önemli fark elde edilmemiştir. Eritrosit agregasyonu ve plazma viskozitesi ölçüm sonuçlarının, nattokinaz uygulanan gruplarda daha düşük bulunmaması ($p>0.05$), kullanılmış olan nattokinaz dozunun yetersiz olabileceğini düşündürmüştür. Bu amaçla daha yüksek dozda (6 mg/gün) nattokinaz uygulamasının plazma fibrinojen düzeyi, kan viskozitesi ve sağ kalım üzerine etkileri farklı 2 deney ile test edilmiştir.

Kan viskozitesi ve plazma fibrinojen düzeyinin yüksek dozda (6 mg/gün) nattokinaz kullanılması ile değişiminin incelendiği ikinci çalışmada, Nat+ÇL grubunda plazma fibrinojen düzeyi Lap ve ÇL gruplarından düşük bulunmakla birlikte fark önemli değildi ($p>0.05$). Benzer şekilde, kan viskozitesi de, özellikle düşük kayma hızlarında, Nat+ÇL grubundaki sıçanlarda diğer gruplardaki sıçanlardan daha düşük bulundu ancak fark istatistiksel olarak önemli bulunmadı ($p>0.05$). Kayma hızının azalmasıyla viskozite değişim hızı ise ÇL grubunda en yüksek Nat+ÇL grubunda ise en düşük bulundu ($p<0.05$).

Sepsis öncesi intragastrik nattokinaz uygulanmasının sepsiste hayatta kalma üzerine etkilerinin araştırıldığı Deney 3’de ÇLD öncesi 1 hafta boyunca beslenme sondası yardımı ile 6 mg/gün nattokinaz verilmiş ve Nat+ÇL grubu ile ÇL grubunun hayatta kalma süreleri kıyaslanmıştır. Yaşam süreleri açısından fark önemli bulunmamıştır. Nattokinazın direkt ve PAİ-1 inhibisyonu yoluyla oluşturduğu fibrinolizin intraabdominal sepsis modelinde yaşam süresi üzerine önemli etkisinin olmaması iki şekilde yorumlanabilir. Yorumlardan ilki uygulanan nattokinaz dozu veya uygulama süresinin yetersiz olma ihtimalidir. Nattokinaz ve çekal ligasyon ile çekal ligasyon gruplarının fibrinojen düzeyleri ve kan viskoziteleri arasındaki farkın

önemli bulunmaması da bu yorumu desteklemektedir. Uygulama süresi ve dozun yeterliliğine ilişkin daha güvenilir bilgi serum PAİ-1 ve fibrinojen yıkım ürünleri düzeylerinin ölçülmesi ile elde edilebilir. Bu çalışmanın planlanması sırasında bahsedilen her iki parametrenin de analiz edilmesi planlanmış ancak PAİ-1 için uygun kitler temin edilemediğinden bu parametre protokolden çıkartılmıştır. Fibrinojen yıkım ürünlerinden birisi olan D-dimer ise ilk deneyde tüm sıçanlarda analiz edilmiş ancak kullanılan kitlerin sensitivitesinin uygun olmaması nedeniyle bulgulara istatistiksel analiz uygulanmamıştır.

İkinci yorum nattokinaz uygulaması sonrası gelişen fibrinoliz ile DİK şiddetinin gerilemesinin sepsiste mortalite üzerine etkisinin kısıtlı denek sayısı nedeniyle belirgin olmaması olabilir. Sepsis tüm sistem ve organ fonksiyonlarını etkileyen bir sendromdur. Multiorgan yetersizliğine neden olan DİK mortalite üzerine direkt etkili olsa da sepsise bağlı ölümün temel nedeni vazojenik şok, ekstrasvasküler alana sıvı kaçağı ve katekolaminlere yanıtızlıktır. DİK ve dolayısı ile DİK tedavisinin septik hayvanlarda mortalite üzerine etkilerinin değerlendirilmesinde denek sayılarının artırılması daha uygun olabilir.

Sepsiste serum fibrinojen düzeyleri, eritrosit agregasyonu ve kan viskozitesi gibi hemoreolojik parametrelerde artış olduğu bilinmektedir. Bu faktörlerin normal değerlere yaklaştırılması sepsise bağlı problemlerin sıklığının veya şiddetinin azalmasına neden olabilir. Fibrinolitik aktivitenin ise sepsiste organ yetmezliği gelişmesinden koruyucu olduğu düşünülmektedir. Sentetik fibrinoliz inhibitörü olan traneksamik asit ile tedavi edilen septik sıçanlarda glomeruler fibrin birikiminin ve renal yetersizliğin arttığı bildirilmiştir (54). Trombolitik aktiviteleri nedeniyle klinikte son yıllarda yaygın kullanılmakta olan plazminojen aktivatörlerinin (t-PA, ürokinaz) deneysel sepsis modellerinde sistemik uygulama sonrasında DİK'e bağlı organ yetersizliklerini azalttığı gösterilmiştir (55, 56, 57). Asakura (55) ve ark çalışmasında lipopolisakkarit enjeksiyonu sonrası deneysel sepsis ve DİK oluşturulmuş sıçanlara uygulanan intravenöz ürokinazın plazma PAİ-1 aktivitesini ve glomeruler fibrin birikimini baskıladığı bildirilmiştir. Hardaway (56) ve ark. ise domuzlarda oluşturdukları deneysel sepsis modelinde intravenöz E. Coli uygulaması sonrası ürokinaz verilmesinin mortalite, asidoz ve koagülasyon bozukluklarını engellediğini göstermiştir. Tavşanlarda deneysel sepsis modeli ile yapılan bir çalışmada endotoksin enjeksiyonu sonrası t-PA uygulamasının renal fibrin birikimi ve mortaliteyi azalttığı gösterilmiştir (57). Bahsedilen çalışmalarda deney hayvanlarında kanama komplikasyonu ve buna bağlı ölüm bildirmemiştir. Ancak plazminojen aktivatörlerinin trombolitik amaçlı klinik kullanımı sırasında intrakranial kanama başta olmak üzere kanama komplikasyonları görülmektedir (58). Plazminojen aktivatörleri ile deneysel sepsis modellerinde DİK tedavisinde ümit verici sonuçlar bulunmakla birlikte sepsis tedavisinde klinik kullanımlarını araştıran bir çalışma bulunmamaktadır.

Plazminojen aktivasyonu sağlayarak gösterdikleri fibrinolitik/fibrinojenolitik özellikleri nedeniyle deneysel sepsis modellerinde kullanılmış diğer bir ajan grubu PAİ-1 inhibitörleridir. XR5118 PAİ-1'e bağlanarak plazma PAİ-1 aktivitesini azalttığı gösterilmiş, trombüs oluşumunu engelleyici ve trombolitik etkileri olduğu in vivo ortamda kanıtlanmış bir ajandır ancak DİK tedavisinde kullanımına ilişkin

çalışma bulunmamaktadır (59). Monoklonal antikor MA-33B8 ile deneysel sepsis modelinde PAİ-1 inhibisyonu sağlanmış ve tavşan böbreklerinde fibrin birikiminde azalma oluşturduğu gösterilmiştir (60). Farelerde lipopolisakkarit enjeksiyonu yoluyla sepsis oluşturulması öncesi 8 gün boyunca oral T -686 (PAİ-1 inhibitörü) mortaliteyi doza bağımlı olarak azaltmıştır (61).

Fibrinolitik özellikleri bulunan mikrobiyal enzimlerden en iyi bilinen ajanlar streptokinaz ve stafilokinaz'dır. Her iki ajan da özellikle miyokard infarktüsü ve iskemik inmenin trombolizis yöntemi ile tedavisinde başarı ile kullanılmaktadır (50). Lokal intravasküler tromboz eritilmesi dışında sepsise bağlı gelişen DİK tedavisinde kullanımı ile ilişkili çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada fibrinolitik/fibrinojenolitik etkinliğinin sepsiste kan fibrinojen düzeyine, kan viskozitesine ve mortaliteye etkilerinin incelendiği nattokinaz enzimi de mikrobiyal fibrinolitik enzimler arasında sayılmaktadır (20).

Nattokinazın fibrinolitik etkinliğini araştıran birçok in vivo ve in vitro çalışma bulunmaktadır. Femoral vende trombüs oluşturulması sonrası oral nattokinaz verilen köpeklerin 5 saat sonra yapılan anjiyografilerinde reperfüzyonun başladığı ancak plasebo grubunda pıhtı erimesi gözlenmediği bildirilmiştir (36). Sıçanlarda karotid arter trombüsünün eritilmesinde nattokinaz ve plazminin etkinliği kıyaslanmış ve kan akımı daha yüksek oranda (nattokinaz: %62, plazmin: %15.8) sağlanmıştır (63). Enzimin oral uygulanması sonrası insan ve deney hayvanlarında sistolik ve diyastolik kan basınçlarının düştüğü, yüksek riskli bireylerde ekstremitelerde şişmenin azaldığı ve derin ven trombozu riskinin azaldığı bildirilmiştir (64, 65). Nattokinazın trombolitik amaç dışında sepsiste gelişen DİK tedavisinde etkinliği ile ilgili çalışma bulunmamaktadır.

Sepsis; yoğun bakım hastaları, bağışıklık sistemi bozukluğu olanlar ve benzeri yüksek risk gruplarında görülme sıklığı yüksek olan bir durumdur. Sepsis tedavisi erken tanı, antibiyoterapi, volüm replasmanı, vazoaktif ve pozitif inotrop medikasyon, mekanik ventilasyon ve temel yoğun bakım tedavilerini içermektedir (66). Sepsise bağlı DİK ve buna bağlı multiorgan yetersizliği tedavisinde kabul gören tek tedavi rekombinant aktif protein C (drotrecogin alfa) uygulamasıdır (67). Ancak bu tedavi kanama komplikasyonlarının sıklığı ve yüksek maliyeti nedeniyle yalnızca seçilmiş vakalarda uygulanmaktadır. Fibrinolitik/fibrinojenolitik etkisi mevcut olan, oral beslenme solüsyonları ile verilebilen, kanama komplikasyonu olmayan, yan etkisi bulunmayan, sepsis açısından risk gruplarında rutin beslenmede kullanılabilen, düşük maliyetli bir ajan olan nattokinaz sepsise bağlı DİK tedavisinde yeni ufuklar açabilir.

Sonuç olarak, sıçanlarda çekal ligasyon ve delme ile oluşturulan intraabdominal sepsis öncesi 7 gün boyunca 0.6mg/gün veya 6 mg/gün dozlarında intragastrik nattokinaz verilmesi plazma fibrinojen seviyesi, hemoreolojik parametreler ve sepsise bağlı mortalite üzerine istatistiksel olarak önemli bir etki oluşturmamıştır. Ancak farkın önemli olmamasının uygulanan nattokinaz dozu, uygulama süresi ve denek sayısı ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

SONUÇ

1. Çalışma sonucunda, düşük dozda (0.6 mg/gün) nattokinaz uygulanması ile plazma fibrinojen düzeyi, plazma viskozitesi, eritrosit agregasyonu ve deformabilitesinde oluşan değişikliklerin araştırıldığı Deney 1’de, nattokinaz uygulanan gruplarda plazma fibrinojen düzeyi, plazma viskozitesi ve eritrosit agregasyonunda istatistiksel olarak önemli bulunmayan azalma tespit edildi. Eritrosit deformabilitesi bulgularında ise gruplar arasında fark görülmedi.
2. Deney 1’de alınan sonuçların uygulanan nattokinaz dozunun yetersiz olduğunu düşündürmesi nedeniyle yapılan Deney 2’de, yüksek dozda (6 mg/gün) nattokinaz ve ÇLD uygulanan sıçanların kan viskozitesi ve plazma fibrinojen düzeyleri ÇL ve Lap grupları ile karşılaştırıldı. Sıçanların ortalama fibrinojen düzeyleri Lap grubunda 218.5 ± 29.6 mg/dl, ÇL grubunda 239.2 ± 22.3 mg/dl ve Nat+ÇL grubunda ise 212.5 ± 49.9 mg/dl tespit edildi. Nat+ÇL grubundaki sıçanlara ait fibrinojen düzeyi ortalaması ÇL ve Lap gruplarından düşük olmakla birlikte değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmadı.
3. RheologTM ile farklı kayma hızlarında yapılan kan viskozitesi ölçümleri sonucu düşük kayma hızlarında (1-10 /saniye) Nat+ÇL grubunda yer alan sıçanların tam kan viskozitesi ortalamaları Lap ve ÇL grubuna göre daha düşük olmakla birlikte fark istatistiksel olarak önemli bulunmadı. Benzer kayma hızlarında gruplar arası farkların ikili analizi yapıldığında Nat+ÇL grubu ile diğer gruplar arasında önemli fark elde edilemedi.
4. Yüksek dozda (6 mg/gün) nattokinazın sepsiste hayatta kalma üzerine etkilerinin araştırıldığı Deney 3’de Nat+ÇL grubundaki sıçanların gözlem süresi olan 196 saat sonunda hayatta kalma oranı %50 ve ortalama hayatta kalma süresi 133.7 ± 24.0 saat, ÇL grubundaki sıçanların ise hayatta kalma oranı nattokinaz grubu ile benzer (%50) olmakla birlikte ortalama hayatta kalma süreleri 123.1 ± 23.7 bulundu. Yapılan Kaplan Meier yaşam süresi analizi sonucunda iki grup arasında istatistiksel olarak önemli fark olmadığı görüldü.

KAYNAKLAR

1. Balk RA. Severe sepsis and septic shock. Definitions, epidemiology and clinical manifestations. Crit Care med 2000; 16: 179-192
2. Urano T, Ihara H, Umemura K et al. The Profibrinolytic Enzyme Subtilisin NAT Purified from *Bacillus subtilis* Cleaves and Inactivates Plasminogen Activator Inhibitor Type 1. J Biol Chem 2001; 276: 24690-24696
3. Pais E, Alexy T, Holsworth RE, Meiselman HJ. Effects of nattokinase, on red blood cell aggregation and whole blood viscosity. Clin Hemorheol Microcirc 2006; 35: 139-142
4. Collins PW, Macchiavello LI, Lewis SJ, et al. Global tests of haemostasis in critically ill patients with severe sepsis syndrome compared to controls. BJH 2006; 135: 220-227
5. Piagnerelli, Zouaoui Boudjeltia K, Vanhaeverbeek M, Vincent JL. Red blood cell rheology in sepsis. Intensive Care Med 2003; 29: 1052-1061
6. Neuenschwander PF, Fiore MM, Morrisey JH. Factor VII autoactivation proceeds via interaction of distinct protease-cofactor and zymogen-cofactor complexes: implications of a two dimensional enzyme kinetic mechanism. J Biol Chem 1993; 268: 21489-21492
7. Esmon CT. The interactions between inflammation and coagulation. BJH 2005; 131: 417-430
8. Broze GJ, Warren LA; Novotny WF, et al. The lipoprotein-associated coagulation inhibitor that inhibits the factor VII-tissue factor complex also inhibits factor Xa: insight into its possible mechanism of action. Blood 1988; 71: 335-343
9. Marcum JA, Rosenberg RD. Anticoagulantly active heparin like molecules from the vascular tissue. Biochemistry 1984; 23; 1730-1737
10. Rezaie AR, Cooper ST, Church FC, Esmon CT. Protein C inhibitor is a potent inhibitor of the thrombin-thrombomodulin complex. J Biol Chem 1995; 270: 25336-25339
11. Huang ZF, Higuchi D, Lasky N, Broze GJ. Tissue factor pathway inhibitor gene disruption produces intrauterine lethality in mice. Blood 1997; 90: 944-951

12. Jalbert LR, Rosen ED, Moons L, et al. Inactivation of the gene for anticoagulant protein C causes lethal perinatal consumptive coagulopathy in mice. *J Clin Invest* 1998; 102: 1481-1488
13. Ishiguro K, Kojima T, Nakayama Y, et al. Complete antithrombin deficiency in mice results in embryonic lethality. *J Clin Invest* 2000; 106: 873-878
14. Esmon CT. The impact of the inflammatory response on coagulation. *Thromb Res* 2004; 114: 321-327
15. Lijnen HR. Pleiotropic functions of plasminogen activator inhibitor-1. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 35-45
16. Mamen EF. The haematological manifestations of sepsis. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41(Suppl A): 17-24
17. Osterud B, Bjorklid E. The tissue factor pathway in disseminated intravascular coagulation. *Semin Thromb Hemost* 2001; 27: 605-617
18. Vincent JL. Microvascular endothelial dysfunction: a renewed appreciation of sepsis pathophysiology. *Crit Care* 2001; 5(Suppl 2): 1-5
19. Hack CE. Fibrinolysis in disseminated intravascular coagulation. *Semin Thromb Hemost* 2001; 27: 633-638
20. Peng Y, Yang X, Zhang Y. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005; 69(2): 126-132
21. Collen D, Lijnen HR. Tissue type plasminogen activator: a historical perspective and personal account. *J Thromb Haemost* 2004; 2(4): 541-546
22. Duffey MJ. Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level 1 evidence studies. *Clin Chem* 2002; 48(8): 1194-1197
23. Friederich PW, Levi M, Biemond BJ, et al. Novel low-molecular-weight inhibitor of PAI-1 (XR5118) promotes endogenous fibrinolysis and reduces postthrombolysis thrombus growth in rabbits. *Blood* 1997; 96: 916-921
24. Sherman DG, Atkinson RP, Chippeldale T, et al. Intravenous ancrod for treatment of acute ischemic stroke: the STAT study. a randomised controlled trial. *Stroke Treatment with Ancrod Trial. JAMA* 2000; 283(18): 2395-2403
25. Swenson S, Markland FS. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. *Toxicon* 2005; 45(8): 1021-39

26. Budzynski AZ. Interaction of hementin with fibrinogen and fibrin. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1991; 2(1): 149-152
27. Collen D, Lijnen HR. Staphylokinase, a fibrin spesfic plasminogen activator with therapeutic potential? *Blood* 1994; 84(3): 680-686
28. Sumi H, Hamada H, Tsushima H, Mihara H, Muraki H. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto- a typical and popular soybeen food in the Japaneese diet. *Experientia* 1987; 43: 1110-1111
29. Fujita M, Nomura K, Honk K, et al. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybeen fermented food in Japan. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 197(3): 1340-1347
30. Zheng Z, Zuo Z Liu Z et al. Construction of a 3D model of nattokinase, a novel fibrinolytic enzyme from *Basillus natto*. A novel nucleophilic catalytic mechanism for nattokinase. *J Mol Graph Model* 2005; 23: 373-380
31. Fujita M, Ito Y, Honk K, Nishimuro S. Characterization of Nattokinase degraded products from human fibrinogen or cross-linked fibrin. *Fibrinolysis* 1995; 9: 157
32. Sumi H, Hamada H, Mihara H, et al. Fibrinolytic effect of the Japaneese traditional food natto (nattokinase). *Thromb Haemost* 1990; 62(1): 549
33. Suzuki Y, Kondo K, Matsumoto Y, et al. Dietary supplementation of fermented soy bean, natto, suppresses intimal thickening and modulates the lysis of mural thrombi after endothelial injury in rat femoral artery. *Life Sci* 2003b; 73: 1289-1298
34. Fujita M, Hong K, Ito Y, et al. Transport of Nattokinase across the rat intestinal tract. *Biol Pharm Bull* 1995; 18:1387-1391
35. Sumi H, Hamada H, Nakanishi K, Hiratani H. Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase. *Acta Haematol* 1990; 84(3): 139-143
36. Merrill EW. Rheology of blood. *Physiol Rev* 1969; 49: 863-888
37. Chien S, Dormandy J, Ernst E, Matrai A eds: *Clin Hemorheology*; Dordrecht/Boston/Lancaster: Martinus Nijhoff Pub 1987; 1-387
38. Lowe GDO, Barbenel, J. C. Plasma and blood viscosity. In Lowe GDO, ed. *Clinical Blood Rheology*1988. CRC Press, Boca Ration Florida. Volume 1: 11-44

39. Rand PW, Baker N, Lacombe E. Effects of plasma viscosity and aggregation in whole blood viscosity. *Am J Physiol* 1970; 218: 115-123
40. Lowe GDO. Nature and clinical importance of blood rheology. In Lowe GDO, ed. *Clinical Blood Rheology* 1988. CRC Press, Boca Ration Florida. Volume 1: 1-10
41. Stoltz JF, Donner M. Hemorheology: Importance of erythrocyte aggregation. *Clin Hemorheol.* 1987; 7: 15-23
42. Rampling MW. Red cell aggregation and yield stress. In Lowe GDO, ed. *Clinical Blood Rheology* 1988. CRC Press, Boca Ration Florida. Volume 1: 65-86
43. Weng X, Cloutier G, Beaulieu R, et al. Influence of acute phase proteins on erythrocyte aggregation. *Am J Physiol* 1996; 271: H2346-2352
44. Shiga T, Maeda N, Kon K. Erythrocyte rheology. *Critical reviews in Oncology and Hematol* 1990; 10: 9-48
45. Meisselman HJ. Red blood cell role in RBC aggregation: 1963-1993 and beyond. *Clin Hemorheol* 1993; 13: 575-592
46. Baskurt OK, Meiselman HJ. Blood Rheology and Hemodynamics. *Semin Thromb Hemost* 2003; 29(5): 435-450
47. Mohandas N. Molecular basis for red cell membrane viscoelastic properties. *Biochem Soc Trans* 1992; 20: 776-782
48. Mohandas N, Chaisi JA, Shohet SB. The influence of membrane skeleton on red cell deformability, membrane material properties, and shape. *semin Hematol* 1983; 20: 225-242
49. Chien S. Red cell deformability and its relevance to blood flow. *Ann Rev Physiol* 1987; 49: 177-192
50. Sheetz MP. Membrane skeletal dynamics: Role in modulation of red cell deformability, mobility of transmembrane proteins, and shape. *semin Hematol* 1983; 20: 175-188
51. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29: 1303-1310
52. Levi M, Ten Cate H. Disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med* 1999; 341: 586-592

53. Dixon B. The role of microvascular thrombosis in sepsis. *Anaesth Intensive Care* 2004; 32: 619-629
54. Asakura H, Sano Y, Omote M, et al. Significance of decreased plasma D-dimer levels following lipopolysaccharide-induced disseminated intravascular coagulation in rats. *Int J Hematol* 2004; 79: 394-399
55. Asakura H, Asamura R, Ontachi Y, et al. Beneficial effects of urokinase on lipopolysaccharide-induced disseminated intravascular coagulation in rats: focus on organ function and endotelin levels. *Thromb Haemost* 2005; 93(4): 724-728
56. Hardaway RM, Williams CH, Sun Y. A new approach to the treatment of experimental septic shock. *J Surg Res* 1996; &1(2): 311-316
57. Munoz MC, Montes R, Hermida J, et al. Effect of the administration of recombinant hirudin and /or tissue-plasminogen activator (t-PA) on endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation model in rabbits. 1999; 105(1): 117-121
58. Marder VJ, Stewart D. Towards safer thrombolytic therapy. *Semin Hematol* 2002; 39(3): 206-216
59. Friederich PW, Lewi M, Biemond BJ, et al. Novel low molecular weight inhibitor of PAI-1(XR-5118) promotes endogenous fibrinolysis and reduces postthrombolysis thrombus growth in rabbits. *Circulation* 1997; 96(3): 916-921
60. Montes R, Declerck PJ, Calvo A, et al. Prevention of renal fibrin deposition in endotoxin-induced DIC through inhibition of PAI-1. *Thromb Haemost* 2000; 84(1): 65-70
61. Murakami J, Ohtani A, Murata S. Protective effect of T-686, an inhibitor of plasminogen activator inhibitor-1 production, against the lethal effect of lipopolysaccharide in mice. *Jpn J Pharmacol* 1997; 75(3): 291-294
62. Kunamnei A, Abdelghani TT, Ellaiah P. Streptokinase-the drug of choice for thrombolytic therapy. *J Thromb Thrombolysis* 2007; 23(1): 9-23
63. Fujita M, Honk K, Ito Y, et al. Trombolytic effect of nattokinase on a chemically induced thrombosis model in rat. *Biol Pharm Bull* 1995; 1387-1391
64. Maruyama M, Sumi H. Effect of natto diet on blood pressure. *JTTAS* 1995
65. Cesarone MR, Belcaro G, Nicolaidis AN, et al. Prevention of venous thrombosis in long-haul flights with flite tabs: The LONFLIT-FLITE Randomised controlled Trial. *Angiology* 2003; 54: 531-539

- 66.** Rivers E, Nguyen B, Havstad S, et al. Early goal directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001; 345(19): 1368-1377
- 67.** Dhainaut JF, Laterre PF, Janes JM, et al. Drotrecogin alfa (activated) in the treatment of severe sepsis patients with multipl organ dysfunction: data from the prowess trial. *Intensive Care Med* 2003; 29(6): 894-900

ÖZGEÇMİŞ

10.04.1973 yılında İstanbul'da dünyaya gelen Melike Cengiz, ilköğrenimini Antalya Namık Kemal İlkokulunda, orta ve lise öğrenimini Antalya Anadolu Lisesinde tamamlayarak 1990 yılında mezun oldu. Aynı yıl Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde tıp eğitimine başlayıp 1996 yılında tıp doktoru ünvanı ile mezun oldu. 1997-1999 yılları arasında Afyon Dinar Ana-Çocuk Sağlığı Merkezinde sorumlu hekim olarak görev yaptı. Mayıs 1999 tarihinde Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalına araştırma görevlisi olarak atandı. Mayıs 2004'de Anesteziyoloji ve Reanimasyon uzmanlığını aldı ve halen aynı bölümde uzman olarak görev yapmaktadır. Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim dalındaki yüksek lisans eğitimine 2005 Bahar döneminde başlamıştır.